

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA  
GUANILATO CICLASA SOLUBLE EN CÉLULAS  
NEURALES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

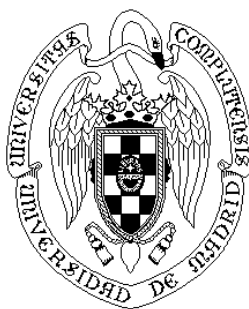
Rut Ferrero Bóveda

Bajo la dirección de la doctora

Magdalena Torres Molina

**Madrid, 2001**

**ISBN:84-669-2008-0**



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Farmacia**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

# **Estudio de la regulación de la guanilato ciclase soluble en células neurales**

**TESIS DOCTORAL**

**Rut Ferrero Bóveda**  
**Madrid, 2001**

**El presente trabajo de investigación se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. D<sup>a</sup> Magdalena Torres.**

**V<sup>o</sup> B<sup>o</sup> Directora**

**Magdalena Torres**

## INDICE

### I. **INTRODUCCIÓN**

1	<b>GUANILATO CICLASAS</b>	
1.1.	Guanilato ciclasa soluble	2
1.1.a.	Dominios estructurales	2
1.1.a.1.	Dominio de unión al grupo hemo	3
1.1.a.2.	Dominios catalíticos y de dimerización	5
1.1.b.	Isoformas	6
1.1.c.	Organización genómica de guanilato ciclasa soluble	8
1.1.d.	Regulación de la expresión de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de guanilato ciclasa soluble	9
1.1.e.	Regulación de la activación de guanilato ciclasa soluble	10
	<i>Tolerancia</i>	11
1.2.	Herramientas farmacológicas para el estudio de la GCs	13
1.2.a.	Los donadores de NO	13
1.2.b.	El YC-1, un activador de la guanilato ciclasa soluble independiente de NO	13
1.2.c.	ODQ, inhibidor de la actividad guanilato ciclasa soluble	15
1.3.	Formas particuladas de las guanilato ciclasas	16
2.	<b>VÍA NO-CG-GMPc</b>	
2.1.	El óxido nítrico como molécula señalizadora	19
2.2.	El óxido nítrico	20
2.2.a.	Química y reactividad del NO	20
2.2.a.1.	Reacción del NO con oxígeno	20
2.2.a.2.	Reacción del NO con superóxido	21
2.2.a.3.	Reacciones de nitrosilación	21
2.2.a.4.	Reacción del NO con oxihemoglobina	22
2.3.	Biosíntesis de óxido nítrico	23
2.3.a.	Estructura de las NOS	24
2.3.a.1.	NOS I ó neural	25
2.3.b.2.	NOS II o inducible	26
2.3.b.3.	NOS III o endotelial	27
3.	<b>DONADORES DE NO</b>	27
3.1.	Nitroprusiato sódico	28
3.2.	Diazeniodiolatos (NONOatos)	29
3.3.	Nitrosotioles	30
3.4.	Nitratos orgánicos	32
4.	<b>SISTEMAS EFECTORES DEL GMPc</b>	
4.1.	Proteína quinasa dependiente de GMPc	32
4.1.a.	Acción sobre el sistema cardiovascular	34
4.1.b.	Inhibición de la agregación plaquetaria	35
4.1.c.	La PKG en el sistema nervioso	35
4.2	Activación cruzada de PKA/PKG	36



4.3. Proteínas de unión a GTP	37
5. EL GMPc Y LA SEÑALIZACIÓN CELULAR	37
5.1. Fosfodiesterasas reguladas por GMPc	38
5.2. Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos	39
6. APOPTOSIS	41
6.1 Caspasas	43
6.2. Inducción de apoptosis	44
6.2.a. El NO como inductor de apoptosis	45
6.2.b. El NO como supresor de la apoptosis	45
6.2.c. Implicación de la vía del GMPc	46
7. MODELOS CELULARES	46
7.1. Modelos celulares de médula adrenal	46
7.1.a. Rutas de 2 <sup>os</sup> mensajeros	50
7.2. Células endoteliales	51
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. MATERIALES	
Productos	53
Instrumental general	55
2. MÉTODOS	
Obtención de células adrenomedulares	57
Purificación de células cromafines y endoteliales	59
1. Gradientes discontinuos de urografina	59
Estimación del número de células	60
Mantenimiento en cultivo	61
2. Gradiente continuo de Percoll	64
Pasaje de células endoteliales	64
Determinación de óxido nítrico	65
Preparación de los donadores de NO	65
1. Medida de óxido nítrico con oxihemoglobina	65
2. Determinación de nitritos	68
Determinación de la viabilidad celular	68
Ensayo fluorimétrico de cuantificación del ADN total	69
Extracción del ADN presente en el citosol	70
Ensayo fluorimétrico de cuantificación del ADN citosólico	71
Electroforesis en geles de agarosa	72
Medida de la actividad de caspasas	72
Estudios inmunocitoquímicos	73
Determinación de los niveles intracelulares de GMPc	74
Detección de la GCs mediante inmunotransferencia	76
Inmunoprecipitación de guanilato ciclase soluble	77
Determinación del estado de fosforilación de la GCs	78
Determinación de catecolaminas en células endoteliales	79
Experimentos de PCR simple y cuantitativa	81
Extracción de ARN	81

<i>Cuantificación de ARN</i>	82
<i>RT-PCR simple</i>	82
<i>RT y PCR- cuantitativa: método de SYBR-green</i>	83
Análisis de datos	84
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>87</b>
<b>IV. RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
1. CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS	89
2. MOLÉCULAS DONADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO	92
2.1. Liberación de NO partir de distintos donadores de NO	92
2.1.a. Determinaciones en ausencia de células	93
2.1.a.1. Determinación de la estequiometría de los donadores de NO	93
2.1.a.2. Liberación de NO al medio de incubación a lo largo del tiempo	94
2.1.a.3. Velocidades de liberación de NO	95
2.1.b. Determinación en presencia de células	96
2.1.b.1. Liberación de NO a partir de donadores en función del tiempo	96
2.1.b.1. Efecto de los donadores de NO sobre los niveles de GMPc en función del tiempo	96
2.2. Producción de GMPc en respuesta a distintas dosis de donadores de NO	98
3. ESTIMULACIÓN DE LA GCs POR YC-1	102
4. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GCs	105
4.1 Desensibilización de la GCs	105
4.1.a. Implicación de las proteínas fosfatasas en la inhibición de GCs	108
4.1.b. Cambios en el nivel de fosforilación de la subunidad $\beta$ de la GCs en respuesta a distintos tratamientos	111
4.1.c. Efecto de la inhibición de PKG sobre los niveles de GMPc inducidos por SNP	115
4.1.c.1. Relación de la inhibición de PKG y Ser/Thr proteínas fosfatasas	117
4.2. Efecto de la toxina pertúsica sobre la acumulación de GMPc	119
5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGENTES ESTIMULADORES DE LA RUTA DURANTE PERIODOS PROLONGADOS	121
5.1. Estudio de la modulación de la actividad de la GCs tras tratamientos prolongados con NO ó YC-1	122
5.1.a. Importancia del estado reductor de la célula para la inducción de tolerancia a NO	125
5.2. Expresión de la enzima GCs	127
5.2.a. Vida media de la enzima GCs	128
5.2.b. Mecanismo de regulación de la expresión	130

5.2.c. ARNm de la GCs	132
6. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A YC-1	134
6.1. Efecto sobre la estructura celular y la capacidad de adhesión celular	134
6.2. Estudio del citoesqueleto celular	139
6.3. Estudio de la densidad celular de los cultivos	143
6.4. Estudio de la funcionalidad de células cromafines	145
6.5. Estudio de la viabilidad celular	146
6.6. Estudio de la integridad del ADN celular	151
6.7. Estudio de la actividad de caspasas	153
<b><i>V DISCUSIÓN GENERAL</i></b>	155
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	175
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	177

***“A pesar de la amplia distribución de la GCs en la mayoría de las células animales, su papel y su significado fisiológico ha sido muy pobremente definido hasta hace relativamente poco tiempo” Adrian Hobbs, 1997.***

La actividad guanilato ciclasa, enzima que cataliza la conversión de GTP en GMPc (GTP-pirofosfato-liasa-ciclasa, EC. 4.6.1.2.), se descubrió por primera vez en el 1969 (Hardman & Sutherland, 1969; Ishikawa et al., 1969; White & Aurbach, 1969). Desde los primeros momentos, fue evidente que se trataba de una proteína diferente de la adenilato ciclasa, responsable de la síntesis del AMPc. Mientras que la adenilato ciclasa (ACs) se encontró solamente en la fracción particulada de homogenados obtenidos a partir de diferentes tejidos, la actividad de la guanilato ciclasa se detectó tanto en la fracción soluble como en la particulada, con una distribución variable dependiendo del tejido (Garbers & Gray, 1974; Kimura & Murad, 1974; Chrisman et al., 1975).

Aunque descubrimientos recientes sugieren que las dos familias de guanilato ciclasas, soluble y particulada, comparten características estructurales comunes y presentan homología en sus secuencias de aminoácidos, difieren en sus mecanismos de activación y regulación.

A mediados de los años 70, se descubrió que el radical libre NO era un potente activador de la GCs (GCs), sugiriendo que varios compuestos que contenían nitrógeno y oxígeno inducían la formación de GMPc mediante un mecanismo que implicaba la liberación de NO. En esos momentos, se pensaba que la biosíntesis de NO estaba restringida a las bacterias nitrificantes y desnitrificantes, y el significado de esa observación en relación con células animales no fue apreciado durante mucho tiempo. Sin embargo, el descubrimiento del factor relajante del endotelio (EDRF) y su identificación como NO, no solo puso de manifiesto que las células animales eran capaces de sintetizar NO, sino que sirvió para identificar a un activador endógeno de la GCs. En ese momento nació la ruta de señalización NO-GCs-GMPc.

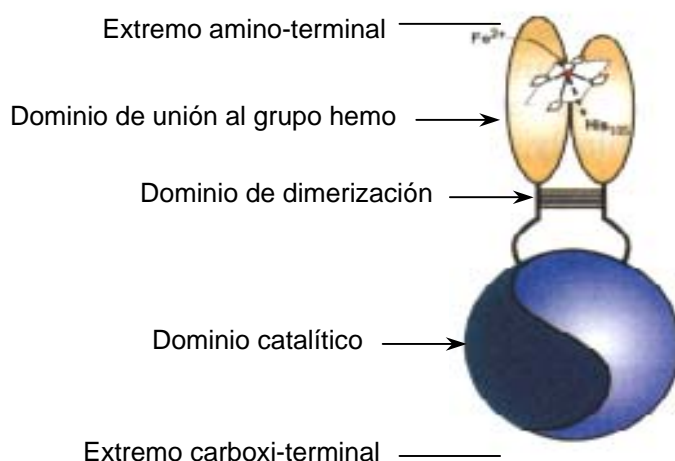
De la misma manera, el mecanismo de activación de la guanilato ciclasa particulada no se estableció hasta el descubrimiento, en 1978, de la acción de pequeños péptidos obtenidos a partir de *Escherichia Coli* (Field et al., 1978). Otros péptidos, aislados a partir de esperma de equinodermo y de tejido cardíaco de mamífero, fueron capaces de estimular la guanilato ciclasa particulada tanto en células intactas como en preparaciones más o menos elaboradas que contenían la fracción de membrana (Suzuki et al., 1981).

### 1.1. Guanilato Ciclasa Soluble

La forma soluble de las enzimas guanilato ciclasas (GCs) está expresada en el citoplasma de prácticamente todas las células de los mamíferos y participa en un gran número de procesos fisiológicos, tales como la inhibición de la agregación plaquetaria, vasodilatación, transmisión de señales neuronales e inmunomodulación (Collier & Vallance, 1989). La mayoría de las funciones del NO y otros vasodilatadores están mediadas por la estimulación de las GCs (Palmer et al., 1987; Chinkers et al., 1989; Becker et al., 1999). Esta enzima es una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , siendo necesaria la expresión de ambas subunidades para la actividad catalítica (Harteneck et al., 1990; Buechler et al., 1991). Cada subunidad posee un dominio regulador de unión al grupo postético hemo en el extremo N-terminal, uno catalítico en el extremo C-terminal que comparte homología de secuencia con los de la forma particulada y adenilato ciclasa, y un dominio central de dimerización (Schulz et al., 1991; Foster et al., 1999). La activación de GCs por NO se produce por una interacción de éste con el grupo hemo. Estudios realizados con GCs purificada han mostrado que se requieren concentraciones del orden de 0,5  $\mu\text{M}$  de NO para producir la máxima activación de esta enzima, siendo el valor calculado de  $\text{EC}_{50}$  de 0,2  $\mu\text{M}$  (Stone & Marletta, 1996).

#### 1.1.a. Dominios estructurales

Cada subunidad de GCs puede ser dividida en tres dominios funcionales: de unión al grupo hemo, de dimerización y catalítico (figura 1).



**Esquema I.1.** Tomado de Lucas et al., 2000.

### 1.1.a.1. Dominio de unión al grupo hemo

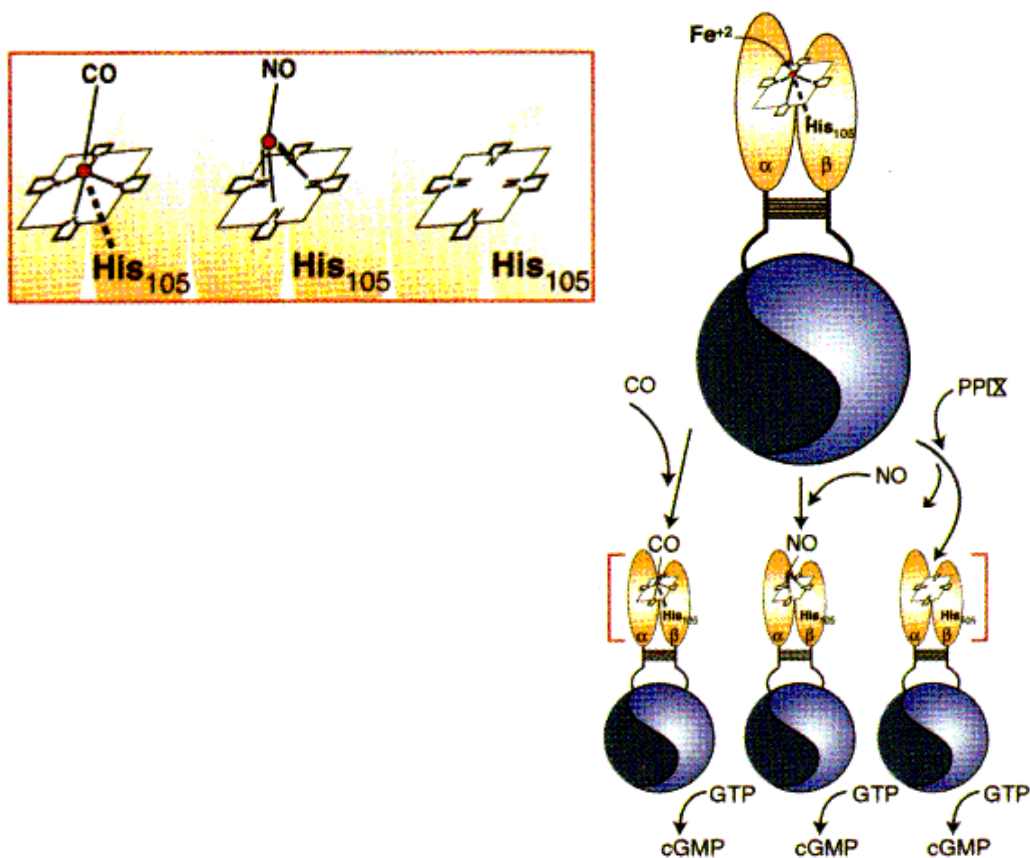
El segmento N-terminal de la GCs constituye el dominio de unión del grupo hemo, el cual confiere a la enzima la sensibilidad al NO (Ignarro et al., 1982; Ohlstein et al., 1982), siendo la región menos conservada entre las diferentes subunidades (Hobbs, 1997). La oxidación del hierro hemínico al estado férrico conlleva una pérdida de la actividad enzimática y, a menudo, una pérdida completa del grupo hemo de la proteína.

Aproximaciones moleculares, como la mutagénesis dirigida, han ayudado a la identificación de los residuos implicados en la unión del grupo hemo a la GCs. La delección de 131 residuos de la región N-terminal de la subunidad  $\alpha$  y la delección de 62 aminoácidos de la región N-terminal de la subunidad  $\beta$  dió lugar a una enzima insensible a NO (Wedel et al., 1994; Fan et al., 1998). Diferentes estudios sugerían que el grupo hemo se unía a la enzima mediante un enlace de coordinación entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y un nitrógeno imidazólico de la histidina que ocupa la posición 105 en la subunidad  $\beta$  (Wedel et al., 1994). La mutación de este residuo resulta en la formación de una GCs carente del grupo hemo (Foerster et al., 1996; Zhao & Marletta, 1997). Además de esta Histidina (105) en la subunidad  $\beta_1$ , la mutación de dos residuos de cisteína altamente conservados en la subunidad  $\beta_1$  (78 y 124), dio lugar a una enzima con menor afinidad por el grupo hemo e insensible al NO (Friebe et al., 1997). Sin embargo, la mutación de las cisteínas equivalentes en la subunidad  $\alpha_1$  no afectó a la sensibilidad al NO ni a la afinidad por el grupo hemo, sugiriendo que el grupo hemo se une fundamentalmente a la región N-terminal de la subunidad  $\beta$  (Friebe et al., 1997; Zhao & Marletta, 1997). La unión del grupo hemo a otras proteínas, como el citocromo C, se produce a través de enlaces tioéster a dos residuos de Cys. Estos datos apoyarían el que las Cys de la subunidad  $\beta$  son fundamentales para la unión del grupo hemo a la guanilato ciclasa.

En la GCs cada heterodímero contiene un grupo hemo con gran afinidad por el NO (Gerzer et al., 1981). Este hecho contrasta con el hemo en otras proteínas, como en la hemoglobina y la mioglobina, que tiene mucha mayor afinidad por el oxígeno formando especies  $\text{Fe}^{2+}$ -oxígeno en vez de  $\text{Fe}^{2+}$ -nitrosil. Para que el NO se una al grupo hemo y active a la GCs, el hierro debe estar en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Existen en la actualidad dos hipótesis del mecanismo de activación de la GCs por NO. Una de ellas postula que el NO se uniría a la sexta posición de coordinación del  $\text{Fe}^{2+}$ ; la formación de este sexto enlace provocaría la ruptura del enlace entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el nitrógeno de la histidina. Este fenómeno conduciría a que el  $\text{Fe}^{2+}$  estuviera de nuevo pentacoordinado siendo el NO quien ocuparía la quinta posición. La formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -nitrosil induciría un cambio conformacional en la enzima, dando lugar a un incremento en su  $V_{\text{max}}$  de 400 veces (Humbert et al., 1990; Stone & Marletta, 1996). La segunda hipótesis sugiere que el NO se uniría al grupo hemo por el lado proximal, rompiendo el enlace del  $\text{Fe}^{2+}$ -histidina, y ocupando el NO la quinta posición de coordinación (Lawson et al., 2000). De la misma forma, el cambio

conformacional inducido en la enzima sería responsable del incremento de su actividad.

La importancia del estado del átomo de hierro plantea la posibilidad de modificar la actividad de la GCs mediante variaciones en el estado reductor de la célula, y explica porqué agentes como tioles y ascorbato incrementan la activación de la enzima, presumiblemente manteniendo el hierro de la metaloporfirina en forma ferrosa sensible a NO (Lucas et al., 2000).



**Esquema I.2. Mecanismo de activación de la GCs.** Tanto el NO como el CO interaccionan con el grupo hemo de la enzima, originando un cambio en su conformación que conduce a la activación de la misma. Sin embargo, el mecanismo de activación de la enzima por PPIX no se conoce con exactitud (tomado de Lucas et al., 2000).

La presencia del grupo hemo no es necesaria para mantener la integridad estructural de la enzima, pudiendo existir un equilibrio entre las formas de la enzima GCs con el grupo hemo incorporado a su estructura o sin éste. Esta incorporación reversible

constituye un mecanismo potencial de regulación de la sensibilidad de la enzima a NO (Foerster et al., 1996).

El CO es capaz de unirse al grupo hemo de la enzima, produciendo una activación de la misma. Aunque la afinidad del CO por el grupo hemo parece ser muy alta, el efecto sobre la actividad catalítica de la GCs no es muy significativo, dado que no es capaz de provocar la ruptura del enlace con la histidina (Deinum et al., 1996). Por tanto, la unión de CO conlleva la formación de un complejo hexa-coordinado, donde el CO ocuparía la 6ª posición. Recientemente, se ha sugerido un papel modulador del CO sobre la vía de señalización GCs/GMPc, ya que se ha observado que el CO incrementa de forma significativa los incrementos del GMPc inducidos en respuesta a NO. Este hecho podría explicarse por la unión de ambos ligandos gaseosos a lados opuestos del grupo hemo, formando aductos estables (Reynolds et al., 2000).

### **1.1.a.2. Dominios catalíticos y de dimerización**

Los dominios catalíticos presentes en los extremos C-terminales de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , comparten una amplia homología con los dominios catalíticos C1 y C2 de la adenilato ciclasa y aquellos de las formas particuladas de GC (Thorpe & Garbers, 1989; Chinkers et al., 1989). Aunque cada subunidad,  $\alpha$  y  $\beta$ , contiene su propio dominio catalítico, la actividad ciclasa requiere la expresión de ambas subunidades. Cada subunidad contribuye con residuos específicos para dar lugar a un único sitio de unión del sustrato y a un único sitio catalítico. (Liu et al., 1997a).

La dimerización está mediada por una región específica que es homóloga a la encontrada en las formas particuladas, y se localiza próxima al dominio catalítico de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .

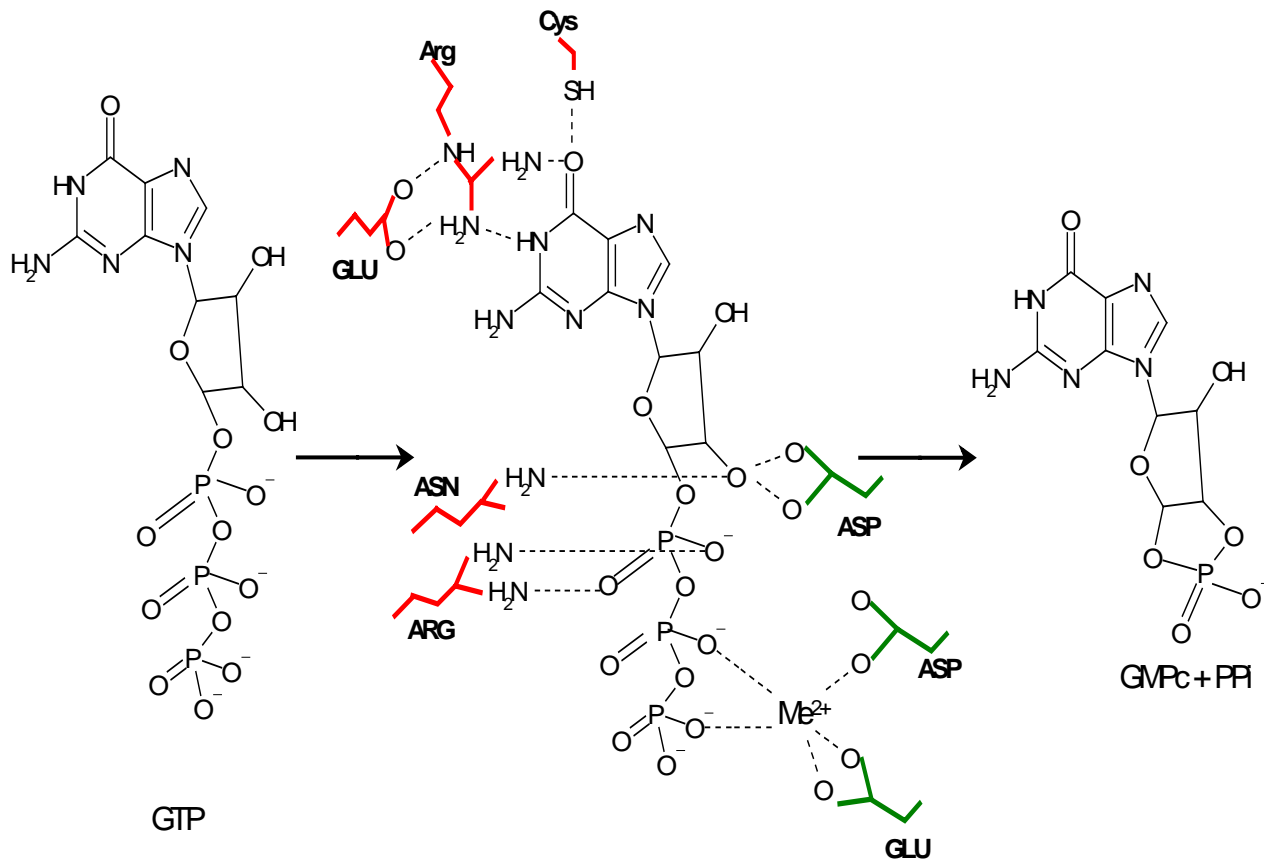
La formación del GMPc a partir de GTP se produce como se ve en la figura 3.

La subunidad  $\alpha$  también juega un papel importante en la modulación de la actividad GCs. Se ha observado que dos mutaciones puntuales en el dominio catalítico de la subunidad  $\alpha_1$  (D513A y D529A) causan una pérdida completa tanto de la actividad basal de la GCs como de la estimulada por SNP, aunque esta subunidad mutada seguía formando heterodímeros con la subunidad  $\beta$  (Yuen et al., 1994). Estos resultados demostraron que dos mutaciones puntuales originan unas proteínas dominantes negativas que podrían bloquear la vía del NO/GMPc de forma eficaz y específica.

Dado que los sitios activos para GC y AC están íntimamente relacionados, estudios mutacionales utilizando enzimas quiméricas han sugerido posibles sitios de especificidad con respecto a sus sustratos, el ATP y GTP (Liu et al., 1997a;b). Un estudio ha revelado como la especificidad de la GC por el GTP está determinada por tres residuos en las posiciones  $\alpha$ R592,  $\beta$ E472 y  $\beta$ C541 (Sunahara et al., 1998).



Las observaciones descritas definen propiedades catalíticas y reguladoras de la GCs que pueden ser atribuidas a distintos dominios de cada subunidad, sugiriendo que puedan existir diferentes mecanismos moleculares de regulación de la GCs (Weitmann et al., 1999).



Estado de transición enzima-sustrato

**Esquema I.3. Mecanismo catalítico de la actividad guanilato ciclasa.** El GTP se une a un sitio catalítico en guanilato ciclasa soluble y a dos en las formas particuladas. Los anillos catalíticos se unen de forma específica a residuos de la subunidad  $\beta$  (rojo) y los fosfatos se unen a los residuos ácidos de la subunidad  $\alpha$  (verde). Ambas subunidades contribuyen al sitio catalítico con residuos aminoácidos.

### 1.1.b. Isoformas

El análisis de GCs a partir de diversos tejidos de mamíferos demostró la existencia de distintas isoformas con diferente composición en cuanto a sus subunidades, de las cuales se han descrito cuatro tipos, ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ), cada una de ellas codificada por un gen diferente (Koesling et al., 1991a;b; Koesling & Friebe, 1999). Aunque aparecieron pruebas de unos subtipos  $\alpha_3$  y  $\beta_3$  en humanos, cuando se han clonado y

comparado las secuencias estas subunidades, se corresponden con las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  descritas en otros organismos (Zabel et al., 1998).

Las subunidades más abundantes y más extendidas en cuanto a su distribución en los distintos tejidos son  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (Garbers et al., 1979). Estas subunidades se clonaron por primera vez a finales de los años 80 a partir de pulmón de rata y bovino por dos grupos diferentes (Koesling et al. 1988; 1990; Nakane et al., 1988; 1990). La expresión de cada una de las subunidades de forma individual da lugar a una proteína que carece de actividad catalítica, mientras que la coexpresión de ambas origina la GCs, susceptible de ser activada por NO (Buechler et al., 1991). Los pesos moleculares de estas dos subunidades son de 82 kDa para la  $\alpha_1$  y 70 kDa la  $\beta_1$  (Kamisaki et al., 1986a), aunque distintos estudios han encontrado pesos moleculares menores para la subunidad  $\alpha$  (Humbert et al., 1990), pudiendo este hecho explicarse por la aparición de una degradación proteolítica de la enzima durante el periodo de purificación. La caracterización de la subunidad de 70 kDa reveló una estructura primaria de su ADN constituida por 3063 nucleótidos (Nakane et al., 1988).

La subunidad  $\beta_2$ , clonada a partir de hígado de rata, tiene un peso molecular de 76 kDa y presenta 86 aminoácidos adicionales en su región C-terminal comparada con la  $\beta_1$ , conteniendo la secuencia consenso (-C-V-V-L-) (Yuen et al., 1990). El motivo CAAX, donde A representa un aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido, es necesario para las modificaciones postraslacionales de isoprenilación o carboximetilación y anclaje a la membrana, secuencia frecuente en la familia de las proteínas *ras* y subunidades  $\gamma$  de proteínas G. Hasta la fecha, no existen evidencias de que las subunidades  $\beta_2$  se puedan asociar a la membrana mediante estas modificaciones.

Aunque la subunidad  $\beta_2$  puede formar heterodímeros con la  $\alpha_1$ , esta holoenzima presenta menor actividad específica que el homodímero  $\alpha_1/\beta_1$ . La coexpresión de  $\beta_2$  con  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  origina una disminución en la formación de los heterodímeros  $\alpha_1/\beta_1$ , probablemente debido a la competición de  $\beta_1$  y  $\beta_2$  por la unión con  $\alpha_1$ . Este hecho podría representar un mecanismo de regulación de la actividad de la enzima GCs  $\alpha_1/\beta_1$ . De hecho, este mecanismo se ha implicado en la aparición de hipertensión en ratas (Gupta et al., 1997a). La menor sensibilidad de la forma  $\beta_2$  por el NO resulta de la falta de un residuo de histidina entre los aminoácidos 86 y 129 de la  $\beta_2$ , indicando que la compleja interacción hemo-ligando entre las subunidades es diferente en las formas de GCs que contienen la subunidad  $\beta_2$  (Gupta et al., 1997a;b).

Se ha clonado una isoforma  $\alpha_2$  de 82 kDa que heterodimeriza con  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , formándose heterodímeros del tipo  $\alpha_2/\beta_1$  que no presentan diferencias funcionales respecto a  $\alpha_1/\beta_1$  (Russwurm et al., 1998). Esta nueva forma  $\alpha_2/\beta_1$  es también sensible al inhibidor selectivo ODQ y al activador independiente de NO, YC-1 (ver en capítulos posteriores). Por lo tanto, a pesar de las diferencias en cuanto a su estructura primaria, las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son iguales en cuanto a su actividad. Existe una variante de la subunidad  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2i}$ ) que contiene 31 aminoácidos adicionales y ha sido identificada en hígado, colon y endotelio humano (Behrends et al., 1995).

Cuando esta nueva forma, así como la subunidad  $\alpha_2$ , se coexpresaron con la subunidad  $\beta_1$  en células COS-7 y Sf9, la proteína  $\alpha_2/\beta_1$  fue sensible al NO, mientras que la  $\alpha_{2i}/\beta_1$  no presentó actividad GCs. Dado que esta nueva subunidad es capaz de dimerizar con la  $\beta_1$  y que, de hecho, la  $\alpha_{2i}$  compite con la  $\alpha_2$  en la formación de dímeros, la expresión de  $\alpha_{2i}$  puede ser un mecanismo potencial de regulación de la actividad GC sensible a NO. Una célula podría modular el grado de respuesta a NO mediante la expresión de distintas cantidades de subunidades alternativas de la subunidad  $\alpha$ .

Aunque hasta el momento no se habían descrito variantes de la subunidad  $\alpha_1$ , recientemente Ritter et al. (2000) han encontrado en algunos tejidos la existencia de tres tipos de ARNm, el mayor de los cuales contiene la secuencia completa para la expresión de la subunidad  $\alpha_1$ . Las otras dos especies de ARNm han perdido parte de la secuencia por corte y empalme. Las células que expresan estas especies alternativas presentan una menor actividad enzimática GCs, proponiendo la idea de que la expresión de variantes de  $\alpha_1$  sea otro mecanismo responsable de una señalización NO-GCs alterada.

En cuanto a las subunidades  $\beta$ , se han encontrado variantes alternativas de las subunidades  $\beta_1$  (Chhajlani et al., 1991) y  $\beta_2$  (Behrends et al., 2000). En el primer caso, la nueva subunidad presenta 33 aminoácidos menos que la forma original. En cuanto a la variante de la subunidad  $\beta_2$ , a esta isoforma le faltan 2 exones homólogos al dominio N-terminal de unión al grupo hemo, sugiriendo que pueda ser insensible a NO. Aunque se desconocen tanto la significación funcional y la distribución de estas nuevas variantes de las isoformas  $\beta$ , estos descubrimientos revelan la heterogeneidad de las subunidades de GCs y la posible diversidad de su regulación.

En cuanto a la ruta GCs-GMPc en invertebrados, recientemente se han detectado dos isoformas de GCs: una  $\beta_3$  a partir de *Manduca sexta*, muy relacionada con  $\beta_1$  pero que no precisa heterodimerización para presentar actividad catalítica (Nighorn et al., 1999), y otra similar a las formas particuladas pero carente del dominio de unión a ligando y que tampoco es activada por NO, sugiriendo la existencia de una nueva forma de activación para esta isoforma de GC (Simpson et al., 1999).

### **1.1.c. Organización genómica de GCs**

En los últimos tiempos, se han llevado a cabo estudios sobre la localización y organización de los genes que codifican para las subunidades de la GCs en humanos que codifican para las isoformas  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (Giuli et al., 1993). Estudios de hibridación in situ han colocalizado ambos genes en el cromosoma cuarto, más exactamente en 4q32, indicando un papel interesante de la regulación y expresión coordinada de ambas subunidades de GCs. Trabajos posteriores han localizado el gen que codifica para  $\alpha_2$  en el cromosoma 11 (Yu et al., 1996), mientras que el de la  $\beta_2$  se encuentra en el cromosoma 13 (Behrends et al., 1999). Por lo tanto, el conocimiento de la localización de las diferentes subunidades de la GCs en los cromosomas 4, 11 y 13,

hará posible determinar si existen causas genéticas en enfermedades humanas relacionadas con la vía NO/GMPc. De hecho, se ha demostrado como la hipertensión en cierto tipo de ratas está asociada a una mayor expresión de la subunidad  $\beta_2$  en células renales y menor expresión de la  $\beta_1$  respecto a animales sanos (Gupta et al., 1997a;b; Deng & Rapp, 1995). Así, la actividad renal disminuida que aparece en animales enfermos puede resultar de una mayor presencia del heterodímero  $\alpha_1/\beta_2$  respecto al  $\alpha_1/\beta_1$  más activo.

En otros animales no mamíferos, como el pez medaka, se ha descrito una organización en tandem de los genes codificantes para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (Mikami et al., 1999). De hecho, se ha encontrado como la región anterior al extremo 5' de la subunidad  $\alpha_1$  puede afectar a la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de forma coordinada. Estas observaciones proporcionan información adicional sobre la existencia de un mecanismo de transcripción temporal y espacialmente coordinada de ambas subunidades de la GCs durante la embriogénesis.

#### **1.1.d. Regulación de la expresión de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de GCs**

En condiciones normales, el NO tiene diversos papeles fisiológicos y bioquímicos importantes en los sistemas cardiovascular y pulmonar. Sustancias como la acetilcolina, originan relajación de los vasos mediante la liberación de NO a partir del endotelio, que incrementa la producción de GMPc en las células de músculo liso, culminando en la fosforilación de diversas proteínas y en la vasodilatación (Moncada et al., 1991a). En ciertas condiciones, se ha demostrado que cambios en los niveles de GCs o en su actividad pueden jugar un importante papel en desórdenes patofisiológicos (Linder et al., 1990; Crawley et al., 1992). Estudios recientes de Ruetten et al. (1999) han demostrado como una regulación negativa de los componentes de la ruta GCs/PKG I pueden representar uno de los eventos tempranos en la patogénesis de la hipertensión. Otros autores han encontrado que niveles altos de GMPc van acompañados de una mayor expresión de GCs (Papapetropoulos et al., 1994).

Los cambios en los niveles y actividad de la GCs no se limitan a estados patológicos sino que también demuestran una expresión regulada según las etapas del desarrollo. Un ejemplo aparece en la disminución de ARNm para  $\alpha_1$  en hígado de ratón o de ambas subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  en pulmones de rata tras el nacimiento (Iida et al., 2000; Bloch et al., 1997).

El grupo de Kloss et al. ha publicado recientemente (2000) como la potencia vasodilatadora de SNP disminuye significativamente con la edad, observando además que el nivel de expresión de la subunidad  $\beta_1$  en animales sanos de edad avanzada era menor que en animales jóvenes. Otros autores han encontrado que la subunidad  $\beta_1$  desaparece completamente en animales viejos, mientras que la subunidad  $\alpha_1$  aún está presente (Chen et al., 2000), sugiriendo que en ciertas condiciones las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  pueden estar reguladas de manera independiente.

### 1.1.e. Regulación de la activación de GCs

Tanto las formas particuladas como la GCs precisan de cationes divalentes como cofactores y moduladores alostéricos para expresar la actividad catalítica máxima. El  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  son dos cofactores positivos para estas enzimas cuya actividad catalítica se basa en la ciclación de nucleótidos. El  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  forman un complejo con el GTP para unirlo al dominio catalítico y que tenga lugar la ciclación enzimática (Waldman & Murad 1987). La disponibilidad de estos cationes puede modular la actividad de la enzima, incrementando tanto su activación como su afinidad por el sustrato (Wolin et al., 1982).

La inhibición de la GCs por  $Ca^{2+}$  está asociada con un incremento de la afinidad de la enzima por su sustrato, ya que la presencia de  $Ca^{2+}$  disminuye tanto la  $K_m$  como la  $V_{max}$  de la GCs. La inhibición es también dependiente de la concentración de GTP, cuanto mayor es la concentración de  $Mg^{2+}$ -GTP se observa una mayor inhibición de la GCs por  $Ca^{2+}$  (Parkinson et al., 1999; Margulis et al., 2000).

Algunos estudios recientes revelan que las subunidades de la GCs son capaces de homodimerizar formando enzimas inactivas, aunque en condiciones normales, el heterodímero se forma de manera preferencial (Zabel et al., 1999). Existe la posibilidad de un equilibrio entre los complejos formados por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la GCs y la regulación de la misma, reflejado en los cambios de la capacidad de hetero y homodimerización.

Es particularmente importante conocer cuál es la secuencia de hechos que suceden tras la activación de la GCs para entender la capacidad de respuesta que se puede esperar a posteriores estímulos que alcancen el interior de la célula. En primer lugar, la disociación del NO una vez que se ha unido a la GCs y ha inducido su activación, se ha calculado en unos 5 segundos a 37°C. Esta tasa de disociación es acelerada en presencia de iones  $Mg^{2+}$  y GTP (Kharitonov et al., 1997). Por otro lado, recientemente se ha descrito que sus productos de reacción GMPc y PPi, también inhiben a la enzima mediante una cinética de primer orden (Lee et al., 2000). Resultados similares se han obtenido para la adenilato ciclasa (Dessauer et al., 1997).

También merece la pena mencionar la identificación de un inhibidor endógeno de la GCs de naturaleza proteica, cuya capacidad de interaccionar con la enzima es independiente de su estado de activación y cuyo sitio de interacción con la enzima se encuentra alejado del sitio hemo (Kim et al., 1994).

Otros mecanismos de regulación de la GCs descritos son ADP-ribosilación y fosforilación. El tratamiento de la GCs purificada de pulmón bovino con toxina pertúsica indujo la ADP-ribosilación de la subunidad  $\beta$ . Esta modificación conlleva un incremento de la actividad estimulada por NO (Tomita et al., 1997). Por otra parte, Zwiller et al. demostraron que la GCs purificada se fosforilaba “in vitro” tanto por la PKC como por la PKA, y en ambos casos la fosforilación conllevaba un incremento de la actividad (Zwiller et al., 1981; 1985). Estos mismos autores

demonstraron que la activación de PKC en células PC12 incrementaba la producción de GMPc (Louis et al., 1993).

Aunque los agentes descritos puedan ejercer un efecto modulador sobre la actividad de la enzima GCs, es importante describir la desensibilización de la enzima. Diversos estudios han descrito que la estimulación de la vía con donadores de NO da lugar a una desensibilización de la GCs a posteriores estímulos inducidos por el mismo (Tsuchida et al., 1995) u otro compuesto nitrosodonador (Davis et al., 1997). Este fenómeno aparece escasos segundos después de poner en contacto al sistema celular con una fuente de NO y la recuperación se produce lentamente, llevando varios minutos (Bellamy et al., 2000). La rápida inducción de este fenómeno y la lenta recuperación son características clásicas asociadas con los receptores de neurotransmisores (Jones et al., 1996). Este fenómeno se diferencia fácilmente de la retroinhibición de GCs aparecida tras exposiciones crónicas a compuestos liberadores de NO.

### ***Tolerancia***

La utilización de nitrovasodilatadores tanto en clínica como a nivel experimental, resulta en la aparición de un fenómeno conocido como tolerancia. Aunque la tolerancia a compuestos que generan NO ha sido ampliamente estudiada, el mecanismo que media este fenómeno no está aún bien definido. Diferentes trabajos relacionan la aparición de la tolerancia con una pérdida de actividad de la GCs. Existen estudios que describen el concepto de tolerancia cruzada entre NO endógeno y donadores exógenos de NO (Papapetropoulos et al., 1998). En el mismo sentido se pronuncian otros autores que han descrito como animales que no expresan la isoforma endotelial de NOS, responden de forma mucho más potente a un estímulo con NO. Mientras que los demás elementos de la vía, como PKG o enzimas fosfodiesterasas, no presentan ningún cambio en su actividad funcional, la actividad de la GCs se encuentra incrementada, fenómeno que podría ser considerado como lo opuesto a la tolerancia (Brandes et al., 2000).

Generalmente, se acepta que la tolerancia no afecta a los pasos por debajo de la activación de GCs, ya que la respuesta a péptidos natriuréticos y a análogos de GMPc permeables no se ven afectadas (Marzin et al., 1993). Sin embargo, algunos trabajos apuntan a que la exposición prolongada a NO o análogos de GMPc conducen a una disminución de la expresión de la PKG I (Soff et al., 1997). Otros autores han descrito que el GMPc media un proceso de disminución de la expresión de NOS endotelial desencadenado por NO en tratamientos prolongados con el compuesto (Munzel et al., 2000).

En cuanto a la expresión de la enzima GCs, cuya modulación redundaría en una regulación de la ruta NO/GMPc, se ha observado que el tratamiento con agentes donadores de NO provoca una disminución en la acumulación de GMPc en respuesta a estos mismos compuestos, sin producirse alteraciones en la  $EC_{50}$  para los mismos (Ujiie et al., 1994). Estos efectos parecen estar mediados por una disminución en los

niveles de ARNm de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ , implicando al NO en la regulación negativa de los niveles de la GCs (Ujiie et al., 1994; Filippov et al., 1997). Es interesante destacar que agentes inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) o de la síntesis de ácidos ribonucleicos (actinomicina D), bloquean la regulación negativa del NO sobre los niveles de GCs, sugiriendo que se produce por un mecanismo mediado por transcripción y traslación (Filippov et al., 1997). Algunos autores han descrito la posibilidad de la influencia del estado de fosforilación de la proteína GCs para la disminución de sus niveles (Liu et al., 1997a;b).

Debido a las similitudes existentes entre el GMPc y el AMPc, se plantea la posibilidad de que exista una regulación cruzada entre las dos vías de señalización. Se ha descrito que tratamientos que elevan los niveles de AMPc intracelular conducen a una menor cantidad de GCs funcional. Esta disminución podría deberse a una disminución de los niveles de ARNm que codifica para la enzima, a una menor síntesis de la enzima (Papapetropoulos et al., 1995), o bien a una mayor velocidad de degradación de la subunidad  $\beta_1$  de la enzima (Shimouchi et al., 1993). Diversos autores han descrito que tratamientos de 18 horas con SNP originaban una disminución de la expresión de la enzima (Ujiie et al., 1994), efecto que se ha relacionado con la activación de PKA (Papapetropoulos et al., 1996a;b) dado que la regulación negativa de la acumulación de GMPc por SNP era inhibida por un compuesto inhibidor de PKA, el H-89. Acompañando estos cambios, los niveles de proteína  $\alpha_1$  disminuyeron cuando las células se pretrataron con zaprinast, apoyando la idea de que el GMPc puede modular los niveles de GCs por una vía que implicaría la activación de PKA (Papapetropoulos et al., 1996a;b).

Otros estudios han revelado que la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la enzima desaparece en animales de edad avanzada, previniendo la capacidad de elevar los niveles de GMPc, y señalando la disminución de una de las subunidades como posible mecanismo de regulación de la ruta (Chen et al. 2000).

Resultados recientemente publicados sobre las posibles causas de la inhibición de la GCs, señalan la importancia del estado reductor de la célula para prevenir el efecto de compuestos presentes en el medio fisiológico y que podrían modificar la activación de la enzima (Dierks & Burstyn, 1998). Así, se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de ácido L-ascórbico disminuyen la acumulación de GMPc en respuesta a la estimulación con NO, vía inhibición directa de la GCs o atrapando el NO antes de alcanzar a la enzima. Estos efectos son prevenidos por las altas concentraciones de GSH existentes en el medio celular en condiciones normales (Schrammel et al., 2000). Se conoce que la actividad de GCs está modulada por el estado redox, dado que tanto los agentes reductores como oxidantes son capaces de incrementar o suprimir la actividad de la enzima dependiendo de su concentración (Waldman & Murad, 1987; Wu et al., 1992). Los mecanismos por los cuales los agentes reductores previenen la tolerancia originada por el tratamiento con SNP

puede estar relacionada con el mantenimiento del hierro del grupo hemo en estado reducido, facilitando por tanto la reacción entre el NO y el hemo, o bien previniendo la oxidación de grupos tioles críticos. Aunque los mecanismos por los cuales los tioles están implicados en la actividad GCs aún no están bien definidos, se ha demostrado que la activación de la enzima por NO conduce a la formación de puentes disulfuros que inactivan reversiblemente a la enzima (Brandwein et al., 1981; Kamisaki et al., 1986b). Algunos estudios han puesto de manifiesto que la exposición de las células a agentes depletores de tioles solubles, conducen a una disminución en la actividad GCs. La oxidación masiva de la enzima conduce igualmente a una pérdida de su actividad enzimática. Algunos autores proponen que la aparición de aniones superóxido podría ser, en parte, causante de la tolerancia a nitroglicerina (Münzel et al., 1995).

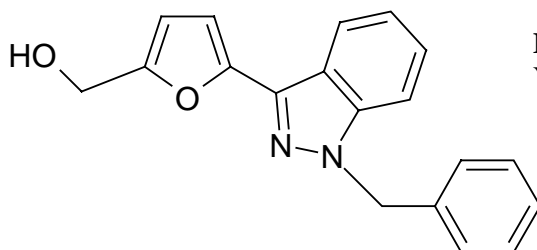
## 1.2. HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE LA GCs

### 1.2.a. Los donadores de NO

Estos agentes se caracterizan porque su descomposición libera al medio al menos una molécula de NO, siendo el NO el activador por excelencia de la enzima GCs objeto de este estudio. Dada la importancia de estos compuestos, su estudio se realiza en otro capítulo.

### 1.2.b. El YC-1, un activador de la GCs independiente de NO

El 1-benzil-3-(5-hidroxi-metil-2-furil)indazol ó YC-1, se ha descrito como un inhibidor de la agregación plaquetaria (Ko et al., 1994; Wu et al., 1995), y de la proliferación de células de músculo liso (Yu et al., 1995).



**Esquema I.4.** Estructura química del YC-1.

Recientemente se ha demostrado que el YC-1 induce la activación de la GCs, actuando bien directamente sobre la enzima produciendo su activación con una  $EC_{50} = 10\text{-}30\ \mu\text{M}$  (Mülsch et al., 1997), bien sensibilizándola respecto a sus activadores gaseosos, el NO y CO, y reduciendo la velocidad de disociación de estos del grupo hemo (Friebe et al., 1999; Friebe & Koesling, 1998; Denninger & Marletta, 1999; Kharitonov et al., 1999). El efecto activador del YC-1 se ha demostrado tanto *in vivo* (Mülsch et al., 1997; Friebe et al., 1998) como con la enzima purificada (Friebe et al.



1996; Friebe & Koesling 1998), originando un efecto sobre la propia enzima independiente de otros mecanismos celulares.

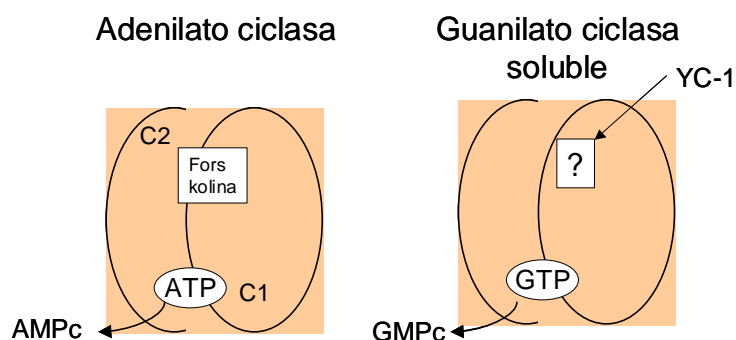
Diversos trabajos han concluido que el YC-1 disminuye la presión sanguínea y es capaz de relajar vasos tolerantes a nitroglicerina (Ruetten et al., 1998), lo cual señala a este compuesto como potente droga antihipertensiva, reforzado por el hecho de que el YC-1 presenta una disociación lenta respecto de la GCs (Friebe & Koesling, 1998).

Toda la expectación surgida alrededor de este compuesto se basa precisamente en su mecanismo de acción, independiente por una parte de NO, pero a su vez potenciador del efecto de éste y sensible a  $O^{2-}$ . La capacidad del  $O^{2-}$  de inhibir la actividad de GCs estimulada por YC-1 podría ser explicada por una interacción del  $O^{2-}$  con el grupo hemo de la enzima (Gerzer et al., 1981), aunque este hecho ha sido rebatido por otros autores como se describe a continuación. El YC-1 no activa la GCs por liberación de NO, lo cual se ha verificado mediante la medida de sus metabolitos, nitritos y nitratos (Mülsch et al., 1997). Además, se ha descrito que este compuesto altera la cinética de la reacción enzimática disminuyendo la  $K_m$  de la enzima para el GTP e incrementando su  $V_{max}$ . El YC-1 además potencia la acción de los activadores gaseosos. La activación de la enzima por YC-1 y NO conjuntamente produjo un efecto superaditivo a concentraciones bajas. Por ejemplo, una concentración de 3  $\mu M$  YC-1, que ejerce pequeños efectos sobre la activación de la GCs y sobre la relajación vascular, incrementó el efecto de la NTG y SNP en 10 veces, tanto en el efecto vasodilatador inducido por estos compuestos, como en los niveles de GMPc observados tras la estimulación de los mismos (Mülsch et al., 1997; Rothermund et al., 2000). El hecho de que la estimulación de la GCs por YC-1 sea independiente de NO puede justificar el efecto aditivo de las acciones de este compuesto respecto a sus activadores gaseosos, NO y CO. El mecanismo propuesto para esta potenciación se basa en una disminución de la velocidad de disociación entre el activador NO y la enzima una vez que ha sido activada.

El CO, que en condiciones fisiológicas no es un buen activador de la enzima GCs, en presencia de YC-1 produce incrementos muy significativos de la síntesis de GMPc. La posibilidad de que el YC-1 modifique la estructura del dominio de unión al grupo hemo en la enzima unida a CO daría lugar a un cambio conformacional, produciendo un incremento de la actividad catalítica sin modificar los ligandos proximales de la proteína (Denninger et al., 2000; Stone & Marletta, 1998; Sharma et al, 1999). La importancia que podría tener el hecho de encontrar un compuesto capaz de modular la respuesta de la GCs a NO ha provocado una intensa investigación sobre los cambios conformacionales que pudieran ser responsables del efecto del YC-1. Aunque en un principio se propuso que la activación de la GCs por parte del YC-1 era dependiente del grupo hemo (Friebe et al. 1996), estos mismos autores han realizado estudios posteriores en los que se presentan argumentos en contra de una interacción directa entre el YC-1 y el grupo hemo de la enzima. Basados en el

estudio de su patrón de absorción y apoyados por el hecho de que el YC-1 se une a la enzima independientemente de cual sea el estado de activación de ésta, e incluso a la enzima carente de dicho grupo prostético, han propuesto que la interacción se produce probablemente en un centro alostérico (Friebe & Koesling, 1998). Toda la controversia respecto al mecanismo de acción del compuesto, nos da una idea del desconocimiento que aún existe sobre los usos potenciales y los efectos asociados que pudiera reportar su aplicación.

Se ha llegado a postular la posibilidad de que existiera una sustancia endógena, similar al YC-1, que se encuentre de forma específica en ciertos tejidos o tipos celulares. Dependiendo de la presencia de dicho modulador, el CO tendría mayores o menores propiedades activadoras sobre la GCs. La existencia de este compuesto explicaría la diferente capacidad activadora que presenta el CO *in vivo* e *in vitro*, donde apenas se detecta su efecto (Friebe et al., 1996). Este hecho estaría apoyado por el modelo que presenta el mismo autor, en el que se propone un sitio regulador en la estructura de la GCs, evolucionado a partir de un dominio de unión a GTP y similar al sitio de unión para la forskolina en la ACs. El YC-1 podría unirse a este sitio afectando a las propiedades catalíticas de la enzima, así como a la disociación del NO (Friebe et al., 1999) (Esquema 5).



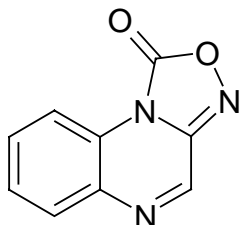
**Esquema I.5.** Esquema tomado de Friebe et al., 1999.

Mientras que en un principio se descartó la capacidad del YC-1 de inhibir la degradación de nucleótidos cíclicos (Ko et al, 1994), datos posteriores demuestran que el YC-1 sí disminuye la actividad de enzimas fosfodiesterasas, prolongando la permanencia del GMPc en el citosol celular. Estos mismos estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento con YC-1 no parece afectar directa ni indirectamente a la actividad de la adenilato ciclasa, ni a la degradación del AMPc (Hwang et al., 1999; Friebe et al., 1998; Galle et al., 1999).

### 1.2.c. ODQ, inhibidor de la actividad GCs

Recientemente se ha descrito al 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalina-1-ona (ODQ) como un inhibidor específico de la GCs, que interacciona con el grupo hemo de la enzima oxidándolo (Schrammel et al., 1996). Ha sido utilizado para examinar la especificidad de la activación de la GCs inducida por donadores de NO (Brunner et

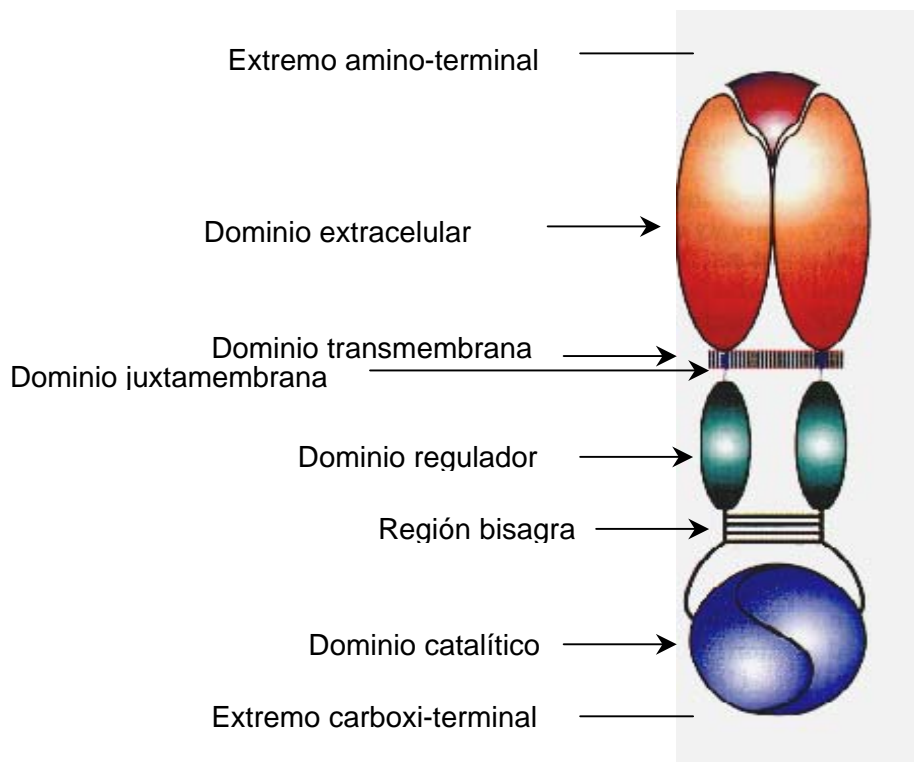
al., 1996). Este compuesto es capaz de prevenir los efectos vasodilatadores de los donadores de NO a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y, por otro lado, no afecta a otros elementos como las GC particuladas, las NO sintasas, adenilato ciclasa ó canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP (Garthwaite et al., 1995; Olson et al., 1997).



**Esquema I.6.** Estructura química del ODQ.

### 1.3. FORMAS PARTICULADAS DE LAS GUANILATO CICLASAS

Se han identificado siete isoformas de la GC particulada en mamíferos, de la GC-A a la GC-G. Presentan estructuras altamente conservadas entre sí, incluyendo un dominio extracelular en el extremo amino terminal que en algunos casos une ligandos bien definidos (GC-A,-B,-C), un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático junto a la membrana, un dominio regulador que comparte una significativa homología con proteínas quinasas, una región bisagra, y un dominio catalítico en el extremo C terminal (Esquema 7).



**Esquema I.7.** Estructura de las GC particuladas. Esquema tomado de Lucas et al., 2000.

Dentro de las estructuras de las GC particuladas, los dominios extracelulares son los que presentan menor homología, reflejando la especificidad funcional para la unión de diferentes ligandos. Se ha descrito que dichos dominios, que representan la zona de unión a los ligandos, poseen sitios de glicosilación variables según el subtipo; la glicosilación de estos dominios parece ser importante para la unión del ligando y la actividad catalítica (Fenrick et al., 1996; Hasegawa et al., 1999a), pero no parece ser necesaria para la distribución de los receptores en la superficie celular (Hasegawa et al., 1999b). Este grupo de enzimas asociadas a membrana poseen un dominio de homología con quinasa que no tienen las formas solubles de la enzima (Aparicio et al., 1996). El receptor guanilato ciclasa se presenta como fosfoproteína en el estado basal y, tras la unión del ligando, tiene lugar una defosforilación del receptor que da lugar a una desensibilización y una disminución de la actividad GC inducida por el ligando (Potter et al., 1994).

Los dominios catalíticos de las enzimas adenilato ciclasas y de las formas particuladas y solubles de la guanilato ciclasa, son estructural y funcionalmente homologas (Krupinski et al., 1989). Estas enzimas precisan de la dimerización para presentar actividad catalítica. Las formas particuladas forman homodímeros, cuyos sitios de unión al sustrato presentan cooperatividad positiva entre sí, obteniendo un coeficiente de Hill para estas enzimas mayor que uno.

Las GCp se han clasificado, según su especificidad de ligando, como receptores de péptidos natriuréticos (GC-A,-B), receptores de unión de péptidos intestinales (GC-C) y receptores huérfanos (GC-D,-E,-F,-G).

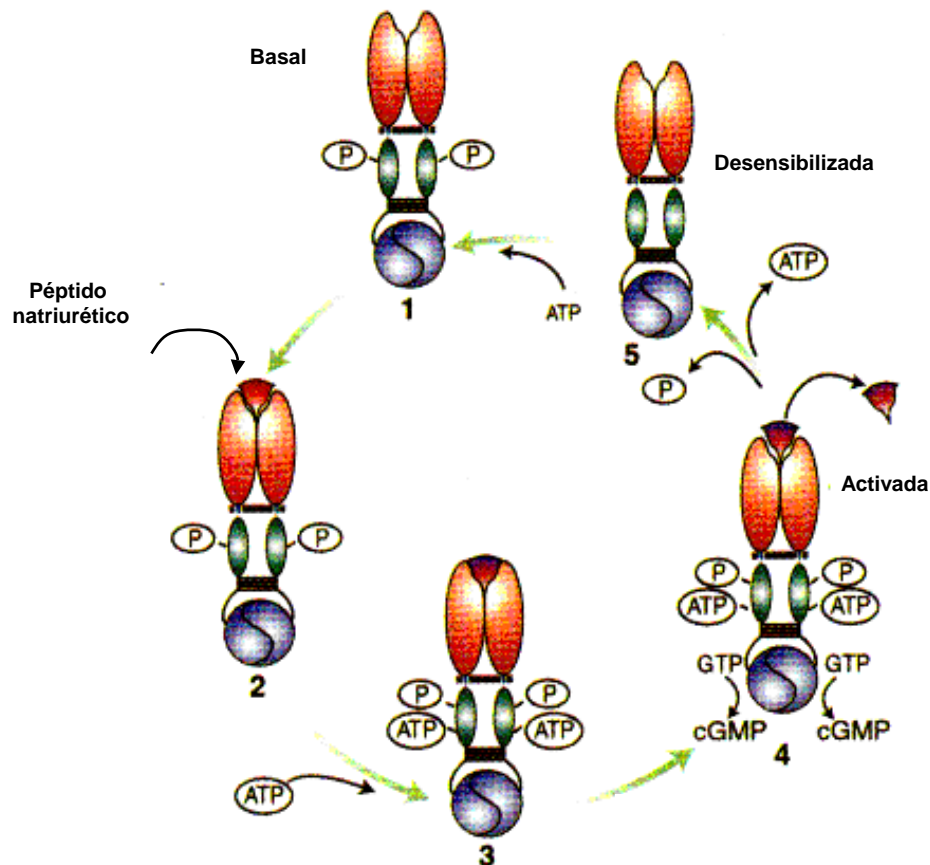
Las isoformas GC-A y GC-B son activadas por unión de péptidos natriuréticos de tipo A, B y C. La forma GC-C se describió originalmente como receptor de la familia de enterotoxinas bacterianas estables al calor (STs), pero recientemente se ha demostrado que existen péptidos endógenos en mamíferos, como la guanilina, uroguanilina y linfoguanilina, que son capaces de unirse y activar estos receptores (Currie et al., 1992; Hamra et al., 1993; Forte et al., 1999a y b).

Las guanilato ciclasas tipo receptores de péptidos natriuréticos, incluyendo GC-A, -B y -G, se expresan ampliamente en multitud de tejidos, como el tejido adiposo, médula adrenal, cerebro, pulmón, hígado, intestino y músculo esquelético. Los subtipos GC-C,-D, -E y -F presentan una cola C terminal aparte de la estructura general descrita para las formas particuladas, y no se encuentran tan ampliamente distribuidos en todos los tejidos, sino que tienen una localización más específica (Fülle et al., 1995; Yang et al., 1995; Schulz et al., 1998).

Hasta el momento, se han caracterizado tres tipos de péptidos natriuréticos: el ANP, BNP y CNP. Los dos primeros presentan en su estructura madura un anillo de 17 aminoácidos y una secuencia C terminal, conservados en ambos tipos hormonales. Además, sus genes codificantes están organizados en tandem (Huang et al., 1996;

Tamura et al., 1996). El péptido natriurético tipo C (CNP) mantiene el anillo, pero carece de la extensión C terminal y su efecto es menos potente que el de los otros dos péptidos.

El principal mecanismo por el cual los péptidos natriuréticos inducen sus efectos fisiológicos implica la activación de los receptores acoplados a guanilato ciclasas y la consecuente acumulación de GMPc intracelular (Esquema 8).



**Esquema I.8. Regulación de las GC particuladas por su ligando.** En estado basal, la GCp se presenta como un complejo homo-oligomerizado (1). Cada monómero de este complejo se encuentra fosforilado en residuos de serina o treonina del dominio quinasa de la enzima. En estas condiciones, el péptido natriurético se une a un sitio de alta afinidad formado por el dímero (2), y eso conlleva una modificación del dominio quinasa resultando en la unión de ATP a este dominio (3). Se produce la activación de los dominios catalíticos y el incremento de la velocidad máxima de producción de GMPc (4). La asociación de ATP con el dominio quinasa reduce la afinidad por el ligando extracelular e induce la defosforilación, la disociación de ATP y el péptido natriurético conduce a una desensibilización de la enzima (5). La regeneración de los receptores al estado basal requiere la refosforilación de los dominios quinasa de la enzima (tomado de Lucas et al., 2000).

Aunque el CNP es menos potente que los otros péptidos estudiados a la hora de inducir efectos fisiológicos como diuresis, natriuresis y relajación del músculo liso

(Sudoh et al., 1990), este péptido representa el ligando primario para la GC-B, presentando una afinidad 50-500 veces superior al ANP y BNP (Koller et al., 1991). El CNP estimula la actividad guanilato ciclasa e incrementa los niveles de GMPc intracelulares en los tejidos que expresan GC-B (Moriwaki et al., 1998; Chrisman & Garbers, 1999; Tao et al., 1999).

## **2. VIA NO-GC-GMPc**

### **2.1. El Oxido Nítrico como molécula señalizadora.**

Fue a mediados del siglo pasado cuando se descubrió la capacidad de la nitroglicerina de originar una dilatación de los vasos, y su aplicación en la clínica para el tratamiento de problemas vasculares ha sido de gran importancia a lo largo de los años siguientes, aún ignorando el mecanismo de acción de esta sustancia (Marsh et al, 2000).

No fue hasta los años setenta cuando se relacionó a la nitroglicerina con la activación de la enzima GCs y el consecuente incremento en los niveles de GMPc intracelular. Durante la década siguiente, se intensificó la investigación sobre el campo, llegándose en 1987 a establecer que el NO radical ( $\text{NO} \bullet$ ) era el principio activo de los nitratos orgánicos. Con anterioridad, se había considerado al NO como un gas tóxico, carente de aplicaciones terapéuticas. Primeramente, se descubrió el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y su capacidad de inducir vasodilatación (Furchgott and Zawadski, 1980). Seguidamente, se llegó a concluir que el EDRF era idéntico al NO (Palmer et al. 1987; Ignarro et al., 1987), del cual ya se conocía su capacidad de activar a la GCs (Murad et al., 1978).

Desde entonces se ha producido un progreso revolucionario en el conocimiento de las funciones del NO. Se le ha identificado como el vasodilatador endógeno por excelencia, implicándole en múltiples procesos biológicos. La falta de NO puede originar desórdenes y enfermedades, mientras que concentraciones elevadas del mismo también pueden provocar efectos adversos. Se ha descrito que el NO inhibe enzimas tales como las ribonucleótido reductasas (Kwon et al., 1991; Lepoivre et al., 1991) e inhibe los complejos I y II de la cadena respiratoria mitocondrial al interaccionar con los complejos hierro-azufre (Welsh et al., 1991); del mismo modo inhibe a la aconitasa. También induce la ADP ribosilación e inhibición de otras enzimas como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Brune et al., 1994), y daña directamente el ADN por desaminación de sus bases (Wink et al., 1991; Nguyen et al., 1992). Además, la producción de NO se ha implicado en daños provocados por la isquemia (Bruhwylter et al., 1993), toxicidad neuronal mediada por glutamato (Dawson et al., 1993), inflamación (Billiar et al., 1992), y una de las vías principales de defensa contra virus, bacterias y otros parásitos (Oswald et al., 1994). El NO

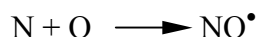
produce adiciones radical-radical, siendo esta reacción con gran probabilidad la responsable de las acciones directas del compuesto.

La vía de transducción de señales mayoritaria cuando el NO se sintetiza por las isoformas constitutivas de NOS, llegándose a concentraciones por debajo del micromolar, es la unión al grupo hemo de la GCs (Ignarro et al., 1982; Waldman & Murad, 1987). Esta señal inicia la conversión de GTP a GMPc. Los niveles de GMPc intracelular regulan la fisiología celular por activación de proteínas quinasas, apertura directa de canales iónicos y alteración de los niveles de nucleótidos cíclicos por regulación de fosfodiesterasas (PDEs). En los siguientes apartados se hace una descripción más detallada de todos los elementos que participan en esta vía de transducción de señales.

## 2.2. EL ÓXIDO NÍTRICO

### 2.2.a. Química y reactividad del NO

El óxido nítrico es una molécula de pequeño tamaño y estructura muy simple, de carácter fuertemente hidrofóbico. A temperatura y presión ambientales, se encuentra en estado de gas incoloro, presentando una solubilidad en agua similar a la del oxígeno puro. Una de las características más relevantes del NO y que le convierten en una molécula única, es que se trata de una especie paramagnética, ya que posee un electrón desapareado.



Sin embargo, aunque muchos de los comportamientos químicos de esta molécula están dominados por el hecho de ser un radical, el NO difiere respecto de otros radicales en que no dimeriza en condiciones de T<sup>a</sup> y presión ambientales. Sin embargo, una reacción que puede producirse fácilmente dando lugar a un compuesto más estable es la de oxidación, originando NO<sup>+</sup>, que reaccionaría con nucleófilos produciendo su nitrosilación.

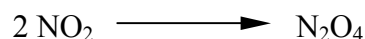
#### 2.2.a.1. Reacción del NO con Oxígeno

El NO es capaz de reaccionar con el oxígeno (O<sub>2</sub>), una de las moléculas biológicamente más significativas, que presenta dos electrones no enlazantes. La reacción de NO con O<sub>2</sub> en estado gaseoso resulta en la formación de NO<sub>2</sub>. La cinética de esta reacción es de segundo orden para el NO y de primer orden para el O<sub>2</sub> tanto en fase gaseosa (Olbrechts et al., 1985) como en acuosa aeróbica (Lewis & Deen, 1994), indicando que la descomposición del NO en el aire no es lineal respecto a la concentración. Cuando la concentración de NO es alta, éste se degradará rápidamente, mientras que a concentraciones menores la velocidad de descomposición será menor.



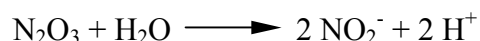
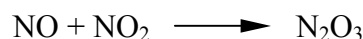
$$-d[\text{NO}]/dt = k [\text{NO}]^2 \cdot [\text{O}_2]$$

En fase gaseosa, el  $\text{NO}_2$  es el producto final, mientras que en solución acuosa se descompone a nitritos y nitratos según las reacciones:



$$-d[\text{NO}]/dt = 4k [\text{NO}]^2 \cdot [\text{O}_2]$$

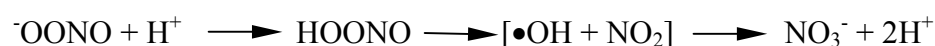
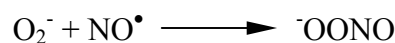
Teniendo en cuenta que el  $\text{NO}$  existe aún en solución a una concentración mayor que la de  $\text{NO}_2$ , las reacciones descritas a continuación se producirán de forma predominante (Feelisch et al., 1991; Lewis & Deen, 1994):



Considerando las reacciones que tienen lugar en solución, deducimos que pueden existir hasta 7 especies de óxidos de nitrógeno simultáneamente en la solución. La importancia de estas especies radica en que, tanto el ácido conjugado de  $\text{NO}_2^-$  como el  $\text{N}_2\text{O}_3$ , pueden originar una reacción de nitrosilación de grupos tioles como se describirá más adelante.

### 2.2.a.2. Reacción de NO con superóxido

El producto de la reducción del  $\text{O}_2$ , el superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), es también capaz de reaccionar con el  $\text{NO}$  formando el peroxinitrito, producto estable (Koppenol et al., 1992). La reacción que a continuación se describe tiene como producto final dos potentes oxidantes que podrían ser responsables de la oxidación de gran variedad de moléculas biológicas (Radi et al., 1991) y, por tanto, de parte de la toxicidad que se ha visto mediada por el  $\text{NO}$ .

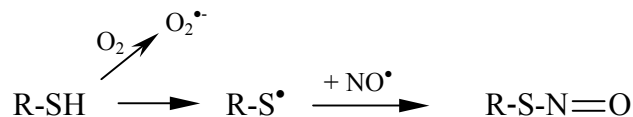


### 2.2.a.3. Reacciones de nitrosilación

La nitrosilación de grupos tioles sirve para prolongar la actividad biológica del  $\text{NO}$ , actuando estos derivados como reservorios que pueden liberar  $\text{NO}$  de forma lenta (Stamler et al., 1992; Keaney et al., 1993). También se ha propuesto que la alteración del estado redox de grupos tioles críticos podría servir para regular la actividad de determinadas proteínas (Lipton et al., 1993). Por ello, el mecanismo de formación de



nitrosotioles alcanza gran relevancia. Aunque esta reacción no estaría favorecida en condiciones anaeróbicas o en ausencia de metales de transición, en presencia de  $O_2$  el tiol podría sufrir una lenta autooxidación para dar lugar a un radical tiil, seguido de una simple adición de radicales con el NO:



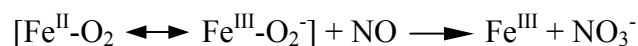
De forma alternativa el NO puede reaccionar con el  $O_2$  para producir especies nitrosantes, como se ha descrito en el apartado anterior, que finalmente llegarían a formar el nitrosotiol y  $NO_2^-$ .

Todas las reacciones de formación de nitrosotioles que dependan de alguna manera del oxígeno, serán lentas y poco eficientes ya que se precisa de una autooxidación del tiol o formación de  $^{\bullet}NO_2$ . Sin embargo, los metales de transición catalizan la oxidación del tiol, favoreciendo la formación de  $Fe^{II}-NO^+$  que atacaría al R-SH directamente, formándose nitrosotioles capaces de transferir el grupo  $NO^+$  a otros grupos sulfidrilos de proteínas para formar uniones covalentes más estables (Lipton et al., 1993; Stamler et al., 1994).

Las reacciones de nitrosación o nitrosilación de sustratos endógenos pueden jugar un importante papel en cuanto al transporte y al mecanismo de acción del NO *in vivo*. Este tipo de alteraciones se han postulado como las responsables de la inhibición por NO de los receptores NMDA (Stamler et al., 1994), la inhibición de adenilato ciclasa (Duhe et al., 1994) y la activación de PKC (Gopalakrichna et al. 1993). Las uniones covalentes formadas serán reversibles cuando el NO regrese a niveles basales. El NO también produce nitrosilación de proteínas G (Goligorsky et al., 1994) y de diferentes tipos de receptores.

#### 2.2.a.4. Reacción de NO con Oxihemoglobina

La unión del  $O_2$  al  $Fe^{II}$  del grupo hemo se produce de la misma forma que se une el NO. Al igual que la unión de este último, el complejo se puede representar como la combinación de dos formas resonantes:

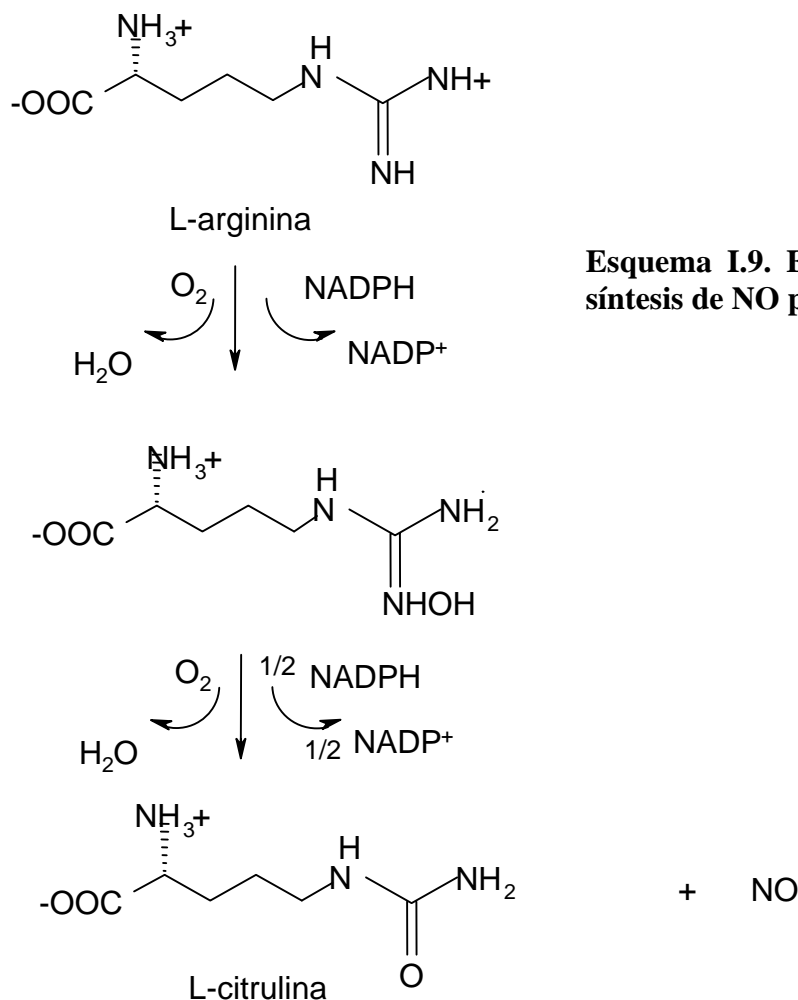


Se produce según una reacción de primer orden dependiente de la concentración de NO que reacciona directamente con el  $O_2$  unido al grupo hemo, sin desplazarlo primero de esta unión, mediante la formación intermedia de nitritos (Herold 1998; Eich et al., 1996).

### 2.3. BIOSÍNTESIS DE ÓXIDO NÍTRICO

Dado que el NO no puede ser almacenado, liberado, ni inactivado por mecanismos convencionales, la regulación biosintética es más relevante en el caso del NO que en el de otros mensajeros, puesto que va a ser la regulación de su síntesis la que determine su concentración.

La familia de enzimas responsables de la síntesis del NO *in vivo* se denomina como óxido nítrico sintasa (NOS) (L-arginina,NADPH-oxígeno oxidoreductasa) y de ella existen tres isoformas: dos que se expresan constitutivamente (NOS I y NOS III) y la tercera que se expresa de forma inducida por diferentes citoquinas (NOS II). La reacción que catalizan todas ellas es similar. La conversión de la arginina a NO es catalizada en dos pasos independientes, en los cuales se produce una oxidación que implica 5 electrones.



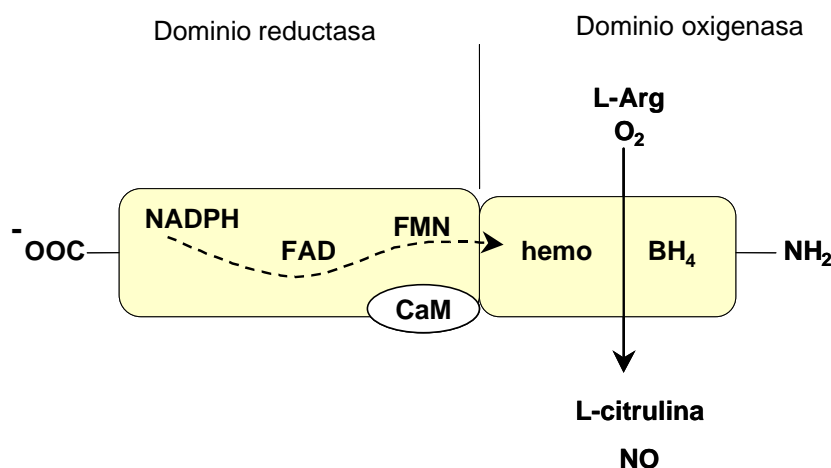
**Esquema I.9. Esquema de la síntesis de NO por NOS.**

La estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre, el NO (Schmidt et al., 1993; Förstermann et al., 1994).

### 2.3.a. Estructura de las NOS

Las formas activas de las isoenzimas NO sintasas son homodímeros. A su vez, cada subunidad posee un dominio reductasa en la región carboxiterminal, y un dominio oxigenasa en la aminoterminal.

Las secuencias de unión al cofactor tetrahidrobiopterina y al sustrato L-arginina, así como el grupo hemo y la proteína moduladora calmodulina, se encuentran en el extremo N-terminal (Bredt et al., 1991), mientras que la unión de los cofactores de oxidoreducción (NADPH, FAD y FMN) se produce en la porción C-terminal de cada subunidad. Existe una interacción reductasa–oxigenasa crucial para la función de la NOS, de forma que el dominio reductasa sólo puede reducir al grupo hemo de la subunidad opuesta del heterodímero, quedando el modelo de activación como se representa en el esquema 10.



**Esquema I.10.** Dominios y cofactores de la NO sintasa. La línea discontinua muestra la transferencia de electrones. Esquema tomado de Pfeifer et al., 2000.

La observación de que la presencia de calmodulina es necesaria para la actividad de NOS permitió la purificación de tres subtipos activos: un tipo endotelial (NOS<sub>e</sub>) (Pollock et al., 1991), uno neuronal (NOS<sub>n</sub>) (Bredt & Snyder, 1990; Mayer et al., 1990; Schmidt et al., 1991) y un tipo inducible (NOS<sub>i</sub>) (Hevel et al., 1991; Yui et al., 1991; Stuehr et al., 1991; Evans et al., 1992). A partir de ahora nos referiremos a estas enzimas como NOS III, NOS I y NOS II respectivamente.

Los polipéptidos que forman cada una de las subunidades de la enzima presentan un peso molecular que varía de 130 a 160 kDa, dependiendo del subtipo de NOS. El criterio de clasificación se basa en las propiedades físicas y bioquímicas de las enzimas purificadas, teniendo en cuenta principalmente la regulación de la actividad por el Ca<sup>2+</sup> libre y su localización subcelular y tisular.

Todas las formas de NOS unen calmodulina en un proceso dependiente (NOS I y NOS III) o independiente (NOS II) de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso de las dos primeras isoformas, a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo ( $<100\text{nM}$ ) no unen calmodulina y por tanto están inactivas, mientras que una elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a niveles  $>500\text{nM}$ , provoca una unión de la calmodulina y por lo tanto una activación de las enzimas. Teniendo en cuenta que la  $K_m$  para la L-arginina de estas isoformas ( $2\text{-}4\text{ }\mu\text{M}$ ) está muy por debajo de la  $[\text{L-arginina}]_i$ , que se encuentra en el rango de  $100\text{-}800\text{ }\mu\text{M}$ , estas enzimas trabajan a concentraciones saturantes de un modo totalmente independiente de la concentración de sustrato (Förstermann et al., 1994). La expresión de NOS I y NOS III es constitutiva en los tejidos en los que están presentes, aunque existen mecanismos de regulación a nivel de su expresión (Förstermann et al., 1995; Bredt & Snyder, 1990).

A diferencia de las dos anteriores, la NOS II no se expresa de manera constitutiva, sino que es inducida por determinados estímulos como infecciones bacterianas y víricas y procesos tumorales. La NOS II une calmodulina de forma independiente a la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

### **2.3.a.1. NOS I o neural**

Esta enzima se localiza en la fracción citosólica soluble y tiene una masa molecular de  $150\text{-}160\text{ kDa}$ . Se ha detectado en numerosas regiones del sistema nervioso central como el bulbo olfatorio accesorio, el núcleo tegmental pedunculopontino, el cerebelo y, en menor cantidad, en el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio principal, los colículos superiores e inferiores, el núcleo supraóptico, así como en la corteza cerebral y en el caudado putamen (Bredt et al., 1990; Dawson et al., 1991). Esta es la isoforma presente en nuestro modelo celular (Rodríguez-Pascual et al., 1996).

La amplia localización de la NOS I en el sistema nervioso central da una idea de la importancia del NO como mensajero biológico en multitud de procesos dentro del sistema nervioso.

En esta isoforma se han identificado unos dominios PDZ que le permiten interactuar con otras proteínas como la PSD-95 en células neurales ó el complejo de la distrofina en células musculares. Estas interacciones permiten una localización de la NOS I próxima a los receptores de NMDA y/o canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo así una rápida activación.

El proceso de activación de esta enzima viene mediada por el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , originada por la apertura de canales iónicos asociados a receptores ionotrópicos específicos de diferentes neurotransmisores. El incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  origina una activación de la calmodulina, dando lugar a la formación del complejo NOS/ $\text{Ca}^{2+}$ -CaM y disparando la actividad catalítica de la enzima. La formación de NO dará lugar a la activación de la ruta de segundos mensajeros de síntesis de GMPc.

Además de la regulación de la NOS I por parte de la calmodulina, se ha descrito que su propio producto de reacción puede regular directamente la actividad de la enzima (Rengasamy et al., 1993; Vickroy et al., 1995; Schwartz et al., 1997), probablemente por unión al grupo hemo (Griscavage et al., 1994). También se ha descrito la regulación por fosforilación (García-Cerdeña et al., 1996). Incluso se ha descrito una proteína que interacciona con la NOS desestabilizando el dímero e inhibiendo su actividad (Jaffrey et al., 1996).

Estudios farmacológicos apoyan la idea de que el NO está implicado en mecanismos de plasticidad sináptica como mensajero retrógrado en procesos de potenciación a largo plazo o LTP, gracias a su capacidad de difundir a la neurona presináptica (Kantor et al., 1996; Roskams et al., 1994; Okere et al., 1996), implicando a su vez la activación de la GCs (Boxal et al., 1996; Calabresi et al., 1999). También existen datos sobre la regulación por parte del NO del desarrollo neural (Bredt & Snyder, 1994; Hess et al., 1993).

Hasta ahora se ha descrito la importancia del NO como mensajero en la transmisión nerviosa. Sin embargo, en determinadas circunstancias, el NO puede convertirse en agente tóxico, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer y Corea de Huntington.

Mediante el empleo de anticuerpos específicos contra la NOS I, se ha detectado esta isoforma en tejidos distintos del sistema nervioso central como la médula espinal, ganglios simpáticos y glándulas adrenales (Dun et al., 1992; 1993). También se encontró en poblaciones neuronales que interaccionan con músculo liso y con vasos sanguíneos de gran calibre, contribuyendo a su dilatación (Desai et al., 1991) y en tejidos no neuronales como epitelio de pulmón, útero, estómago, islotes pancreáticos, mácula densa del riñón y músculo esquelético humano (Kobzik et al., 1994).

### **2.3.a.2. NOS II o inducible**

Esta proteína se encuentra en la fracción soluble y posee un peso molecular de 125-135 kDa. Se diferencia de las otras dos isoformas en que su actividad no es dependiente de  $[Ca^{2+}]_i$  y una vez expresada es activa para producir NO. La inducción de su expresión alcanza un grado tal que las células producen enormes cantidades de NO. Señales como lipopolisacáridos de la pared bacteriana y algunas citoquinas son capaces de iniciar el proceso de síntesis de NOS II. Los altos niveles de NO generados por la enzima causan efectos citotóxicos y citostáticos sobre los microorganismos causantes de la infección o sobre células tumorales (Nathan & Hibbs 1991).

La NOS II se ha detectado en macrófagos, donde fue caracterizada por primera vez, en linfocitos, neutrófilos, hepatocitos y células mesangiales, así como en células endoteliales y musculares de los lechos vasculares, donde contribuye a la hipotensión generalizada asociada a choques sépticos (Buttery et al., 1993). Su expresión puede

inducirse en el sistema nervioso en estados patológicos como infecciones virales e isquemia (Simmons & Murphy, 1992).

### **2.3.a.3. NOS III o endotelial**

Esta proteína se aisló por primera vez a partir de células endoteliales de aorta bovina y, aunque comparte el mecanismo de activación y su expresión constitutiva con la isoforma I, se diferencia de ésta por ser una proteína particulada que se puede traslocar al citosol mediante fosforilación en residuos de serina (Förstermann et al., 1991).

La producción de NO por la isoforma endotelial es la responsable de la dilatación de los vasos (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987). Al igual que en el caso de la NOS I, el proceso se inicia por la interacción de agonistas con receptores específicos, que originan un incremento en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , bien por su entrada a través de canales o por liberación desde orgánulos intracelulares. A su vez, el NO conduce a la activación de la GCs en células musculares y, finalmente, a la fosforilación de ciertos sustratos protéicos que conduce a una disminución de  $[Ca^{2+}]_i$  en dichas células, provocando la relajación de los sistemas contráctiles como se desarrollará más adelante.

## **3. DONADORES DE ÓXIDO NÍTRICO**

El NO participa en numerosos procesos tanto fisiológicos como patofisiológicos, dependiendo de la concentración que se alcance de esta sustancia. Así, concentraciones de NO entre 5 y 450 nM dan lugar a una relajación de los vasos y por tanto a un control de la presión sanguínea, inhibición de la agregación y adhesión de las plaquetas, estando también involucrado en la neurotransmisión. Se han detectado concentraciones de hasta 15  $\mu$ M en las reacciones anafilácticas del organismo ante infecciones bacterianas o víricas o en procesos tumorales (Lehmann, 2000). Estas diferentes acciones del NO están mediadas por diferentes mecanismos. Así, a bajas concentraciones el NO activa fundamentalmente a la enzima GCs, mientras que a elevadas concentraciones el NO puede producir reacciones muy diferentes como la nitrosilación de proteínas (Lipton et al., 1993; Van der Vliet et al., 1995). Por otra parte, otros estudios han puesto de manifiesto que la toxicidad mediada por NO se debe, en parte, a daños en el ADN al producir una desaminación de sus bases (Zhang et al., 1994; Wink et al., 1991).

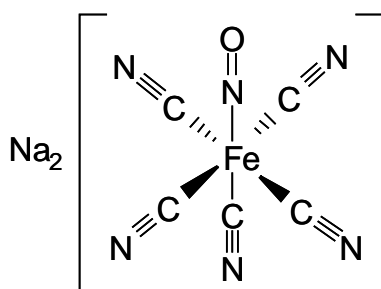
La disparidad entre las múltiples acciones del NO y los efectos tan distintos que ejerce a unas u otras concentraciones, vienen a resaltar la importancia de conocer la capacidad de los diferentes donadores de NO de liberar este compuesto al medio donde se realizan los experimentos.

Dada la capacidad del NO de estimular a la GCs, las medidas de GMPc se han utilizado como medidas indirectas de la producción de NO (Murad, 1986). Sin embargo, existen muy pocos estudios acerca del comportamiento de la actividad de esta enzima cuando se expone a diferentes concentraciones de NO o cuando la exposición a éste es prolongada. Por tanto, las medidas de GMPc, en muchos casos, no son un reflejo de la producción de NO.

El NO como droga activa, tiene un gran potencial terapéutico. Sin embargo, es extremadamente inestable. El NO presente en el aire se oxida a NO<sub>2</sub>, mientras que en solución acuosa y en presencia de oxígeno tiene una vida media muy corta por oxidación a nitritos. Aunque se han descrito algunos compuestos que añadidos a las soluciones de NO son capaces de prevenir la oxidación de éste (Furchgott et al., 1980), actualmente se prefiere la utilización de moléculas asociadas a NO que actúan como donadoras de éste al medio acuoso. A continuación se describen algunas de las drogas utilizadas como donadores de NO.

### 3.1. Nitroprusiato Sódico

Los efectos vasodilatadores del nitroprusiato sódico (SNP) son mediados por la liberación de NO. Sin embargo, el mecanismo de liberación de NO a partir de dicho compuesto sigue siendo incierto. Contrariamente a la creencia generalizada, el SNP no se descompone espontáneamente para liberar NO, a no ser que se le exponga a la luz (Butler et al., 1987); la generación de NO es dependiente de su contacto con tejidos y parece estar mediado por proteínas ligadas a la membrana (Kowaluk et al., 1992). El SNP es un inhibidor de la agregación plaquetaria más potente que los nitratos (Chirkov et al., 1999). Sin embargo, el uso de este compuesto se encuentra limitado por el hecho de que, tras su descomposición para liberar la molécula de NO que posee en su estructura, se producen como metabolitos grupos ciano que podrían originar toxicidad por acumulación en tratamientos de más de 72 horas (Smith et al., 1974).



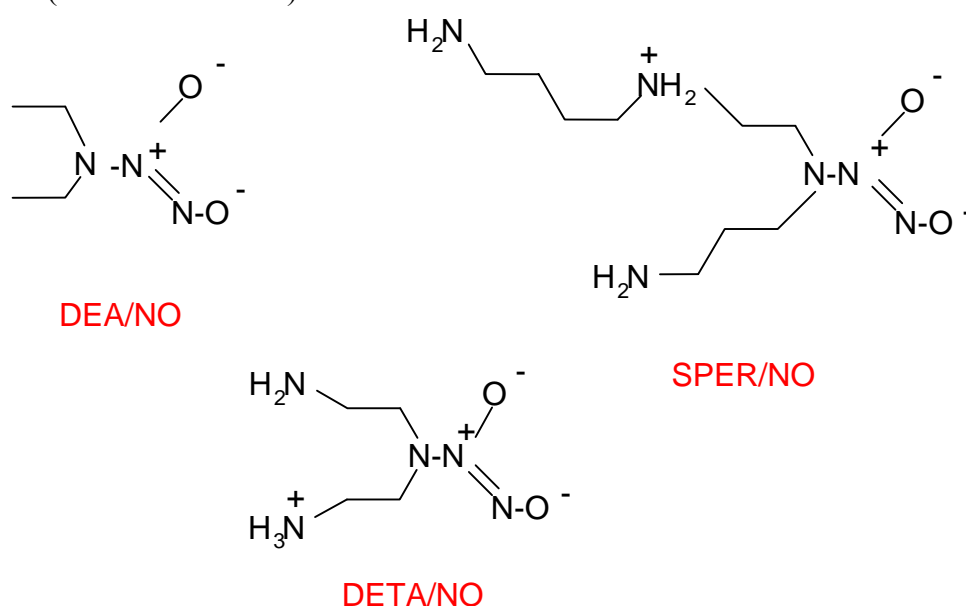
Esquema I.11. Estructura química del SNP

**SNP**

A pesar de los potenciales problemas derivados de su descomposición, es uno de los compuestos más ampliamente utilizados tanto en estudios clínicos como en el laboratorio.

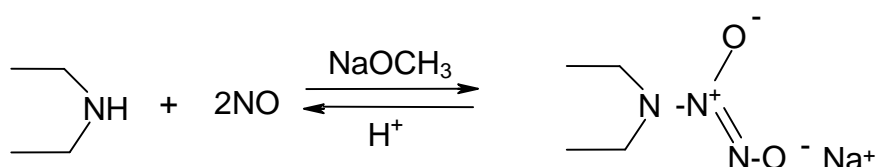
### 3.2. Diazeniodiolatos (NONOatos)

Estos compuestos son sales que presentan el grupo aniónico  $(\text{N}(\text{O})\text{NO})^-$  en la posición 1 de la estructura. Este grupo puede ser generado mediante la adición de dos moléculas de NO a una molécula de un nucleófilo, normalmente una amina secundaria, añadiendo una base para mantener el grupo en su forma aniónica estable. En general, el nucleófilo disuelto se expone a 3-5 atmósferas de NO en condiciones anaeróbicas (Morley et al., 1993), y el producto se puede aislar como un polvo blanco relativamente estable. Los primeros diazeniodiolatos fueron preparados por Drago (Drago et al., 1960), aunque los experimentos realizados por el grupo de Keefer fueron decisivos para establecer la importancia de este tipo de compuestos como una excelente fuente de liberación de NO *in vitro* e *in vivo* de manera controlada (Keefer et al. 1996).



Esquema I.12. Estructuras químicas de los NONOatos

Cuando se disuelve en tampón acuoso a pH fisiológico o se introduce en sangre, el NONOato regenera NO y el nucleófilo original. En la figura aparece el equilibrio de síntesis y disociación del DEA/NO, el NONOato originado a partir de dietilamina, aplicable a los demás compuestos de este grupo.



Aunque estos compuestos son estables en su forma sólida, se descomponen en solución a pH neutro liberando hasta 2 radicales de NO por molécula (Sarkar et al., 1996; Yin et al., 1997; Brilli et al., 1997; Homer et al., 1998; Ekrhovd et al., 1998; Du et al., 1998). La descomposición de los NONOatos sigue una cinética de primer



orden (Ramamurthi et al., 1997) y no es catalizada por tioles o albúmina (Morley et al., 1993). A diferencia de otros tipos de donadores de NO, la eficacia biológica de los NONOatos es predecible a partir de su tasa de descomposición *in vitro*, determinada por el aducto nucleofílico, la temperatura y el pH. Los NONOatos son estables en disoluciones alcalinas, pero la neutralización del medio o su acidificación inicia su descomposición inmediata. La estabilidad no depende, en resumen, más que de su estructura. Por lo tanto, se pueden diseñar diazeniodiolatos de acuerdo con el perfil de liberación deseado, teniendo vidas medias que van desde 1 minuto hasta dos días. Así, una infusión en bolo de DEA/NO sería útil para producir una caída local y pasajera de la presión sanguínea en segundos, mientras que el DETA/NO es capaz de originar un flujo constante de NO durante días.

**Tabla I.1. Vidas medias de NONOatos**

	DEA/NO	DETA/NO	SPER/NO
$t_{1/2}$ a 37°C	2 min	20 hrs	39 min

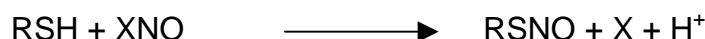
(Keefer et al., 1996)

Las ventajas de este tipo de drogas donadoras de NO respecto al NO puro son la estabilidad de los donadores y la posibilidad de controlar la cantidad, lugar y velocidad de producción de NO. Además, a partir de estos compuestos es posible obtener unas prodrogas selectivas de órganos, que precisan bioactivación a través de enzimas presentes en uno u otro tejido preferentemente (Saavedra et al., 1997).

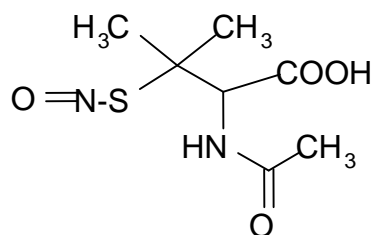
### 3.3. Nitrosotioles

Los S-nitrosotioles (RSNO), también conocidos como tionitritos, son los análogos sulfurados de los nitritos alquílicos RONO. La mayoría de ellos son inestables en su estado puro a temperatura ambiente. La importancia de estos compuestos radica en que, además de descomponerse de manera no enzimática para liberar NO, estos compuestos se han detectado *in vivo* y pueden ser responsables de los mecanismos de procesos biológicos que se han atribuido al NO. Esto ha hecho que se preste más atención a la química y farmacología de estos compuestos.

Los nitrosotioles se forman a partir de tioles y cualquier agente nitrosante electrofílico del tipo XNO, que actúa como agente capaz de ceder una molécula de  $\text{NO}^+$  como se refleja en la ecuación (Williams et al., 1996).



Entre los nitrosotioles que se han logrado purificar y caracterizar, cabe resaltar a la N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) y al nitrosoglutation (GSNO), este último detectado de manera endógena.



SNAP

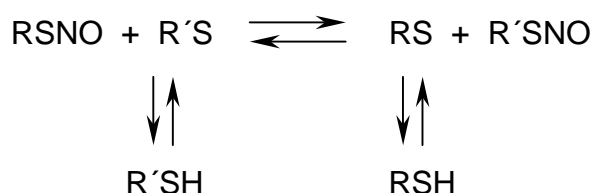
**Esquema I.13. Estructura química del SNAP.**

Entre sus propiedades físicas, cabe destacar el color verde que presenta el SNAP en su estado sólido y su coeficiente de extinción molar a 590 nm ( $\Delta\epsilon = 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Williams et al., 1996). La descomposición de los nitrosotioles se produce según la ecuación:



La descomposición puede ser iniciada por un proceso fotoquímico o inducido por iones de metales de transición, como el  $\text{Cu}^{2+}$ . Sin embargo, en ausencia de luz y metales contaminantes en una solución a temperatura ambiente y pH fisiológico, el compuesto permanecerá estable. (Singh et al., 1996; Sexton et al., 1994). La descomposición de los S-nitrosotioles por fotólisis se produce por una ruptura del enlace S-N, resultando en una liberación de  $\text{NO}^\bullet$ . La importancia de la cantidad de iones metálicos en la descomposición de estos compuestos hace que se hayan obtenido resultados muy diferentes en cuanto a las velocidades de descomposición del SNAP (Ignarro et al., 1981; Mathews et al., 1993).

Otra importante reacción de los nitrosotioles es aquella en que el grupo nitro es transferido a otra molécula con un grupo tiol, esto es, la transnitrosilación. En principio, esta reacción podría ocurrir directamente, actuando los nitrosotioles como portadores de  $\text{NO}^+$ , o indirectamente por una pérdida inicial del NO (ecuación anterior) que luego se oxida a un estado de oxidación superior del nitrógeno que permitirá la nitrosilación de aminas, etc. El intercambio del grupo NO entre nitrosotioles y tioles ha sido demostrado por diferentes autores (Meyer et al., 1994), pero en ciertas condiciones los nitrosotioles se descompondrán a su vez, dando lugar a una mezcla de disulfitos. La reacción implica el ataque del anión tiolato y se produce de manera más rápida que la simple descomposición del compuesto a pH fisiológico, dependiendo del  $\text{pK}_a$  del tiol.



Este proceso puede resultar biológicamente importante en el caso de que el grupo tiol al que se realiza la transferencia sea un residuo de cisteína de una proteína, cuya modificación pueda conducir a una alteración de su actividad.

Esta reacción de transnitrosilación se dará, por ejemplo, entre el SNAP y GSH con una constante de equilibrio de 18,6, mostrando que la formación de GSNO está favorecida (Singh et al., 1996). A su vez, el GSNO reacciona con el GSH intracelular para liberar NO•.

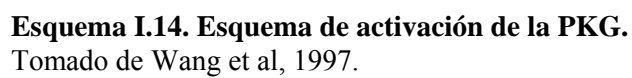
### **3.4. Nitratos orgánicos**

Aunque en los estudios realizados en este trabajo no se ha utilizado ningún compuesto con esta estructura, parece interesante hacer referencia a ellos dado que la NG, primer donador de NO descrito y utilizado, pertenece a este grupo. Los nitratos orgánicos utilizados en terapéutica presentan cuatro, tres (NG), dos o un grupo nitrosilo (NITROOXY) unido a una molécula orgánica simple que hace de portadora. Su potencia farmacodinámica disminuye en ese mismo orden. Estos compuestos producen una relajación de la musculatura de los vasos, actuando preferentemente sobre las venas (Parker et al., 1987) por liberación de NO a través de un paso reductor (Ahlner et al., 1991). A pesar de la intensa investigación al respecto, el mecanismo responsable de la liberación de NO a partir de estos compuestos es pobremente comprendido. La estabilidad de los compuestos orgánicos es ampliamente reconocida, así como el hecho de que no se descomponen espontáneamente para liberar NO. Por ello, se han señalado diversas enzimas celulares como responsables de las reacciones que conducen a la liberación del NO. Algunas de las enzimas de las cuales sí han aparecido datos más convincentes son la glutation-S-transferasa (Simon et al., 1996), la citocromo P450 reductasa (McGuire et al., 1998) o bien una combinación de procesos enzimáticos y no enzimáticos.

## **4. SISTEMAS EFECTORES DEL GMPc**

### **4.1. PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE GMPc**

Tras el incremento intracelular de los niveles de GMPc por activación de la GCs o por inhibición de la degradación del GMPc mediada por fosfodiesterasas, el próximo paso en la acción del nucleótido cíclico es la estimulación de una proteína quinasa dependiente de GMPc (Gill et al. 1976). Estas enzimas son proteínas serina/treonina quinasas de las cuales se han descrito dos subtipos en tejidos de mamíferos, PKG tipo I con una localización citosólica y la PKG II asociada a membranas (Hofmann et al., 1992, Butt et al., 1993; Francis & Corbin, 1994a y b).



**Esquema I.14. Esquema de activación de la PKG.**  
Tomado de Wang et al, 1997.

El holoenzima del tipo I es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas de unos 76 kDa, apareciendo dos subtipos de esta enzima, según un proceso de corte y empalme alternativo a partir del mismo gen, denominadas I $\alpha$  y I $\beta$ . El tipo II también es un dímero compuesto de dos subunidades iguales de 86 kDa cada una (Gamm et al., 1995).

La secuencia de aminoácidos de cada subunidad se ha dividido en seis dominios, de los cuales el 2 y 3 son sitios de unión a GMPc de distinta afinidad. Así, cada molécula del enzima une dos moléculas de GMPc. Los sitios de unión de GMPc se diferencian entre sí por sus parámetros cinéticos: mientras que uno de ellos, denominado lento, presenta mayor afinidad por el sustrato y se disocia más lentamente de éste, el otro, denominado rápido, posee menor afinidad y por lo tanto se disocia mucho más rápidamente. Entre ambos sitios aparece cooperatividad positiva, es decir, la unión del ligando a ambos dominios enlentece la disociación del mismo, prolongando la activación de la enzima. Además, la ocupación de ambos sitios es necesaria para la activación completa de la enzima.

Además de los dominios de unión a GMPc, estas enzimas presentan un dominio de dimerización en el extremo aminoterminal, un dominio catalítico, uno autoinhibitorio y un sitio de autofosforilación. Los subtipos I y II de la PKG se autofosforilan *in vitro* en presencia de Mg<sup>2+</sup> y ATP (Francis & Corbin, 1994b). Este proceso no se ve afectado por la presencia de sustrato, sugiriendo que se produce de forma preferente sobre la fosforilación de sustratos exógenos. La autofosforilación en el caso de la PKG I $\alpha$  incrementa la disociación del GMPc del sitio de alta afinidad, incrementando, en cambio, la afinidad del AMPc para este sitio, apareciendo así el fenómeno de activación cruzada que existe entre las dos vías del AMPc y GMPc (Butt et al., 1993).

En cuanto a su distribución en los tejidos, mencionar que la PKG I se expresa en cantidades importantes en músculo liso, plaquetas y células de Purkinje en el cerebelo (Kleppisch et al., 1999; Keilbach et al., 1992). Sin embargo, el subtipo II se ha encontrado en la mucosa intestinal (Markert et al., 1995), hígado (Gambaryan et al., 1996) y regiones específicas del cerebro (El-Husseini et al., 1998). La amplia expresión de las PKG se refleja en la diversidad de funciones que presentan, estableciendo a estas enzimas como mediadores predominantes de la cascada de señalización del GMPc.

#### **4.1.a. Acción sobre el sistema cardiovascular**

La capacidad de distintos compuestos de elevar los niveles de GMPc intracelular, o los análogos de éste de producir la relajación de los vasos sanguíneos, sugirió por primera vez la implicación de la PKG en los mecanismos de vasodilatación. Recientemente, se han llevado a cabo nuevos estudios, y se ha visto la aparición de hipertensión en animales manipulados genéticamente para no expresar PKG I,

reafirmando la implicación de la PKG en los bien conocidos efectos vasodilatadores del NO (Pfeifer et al., 1998). Aunque el músculo liso presenta gran número de proteínas que podrían ser fosforiladas por PKG I, aún no se ha descrito una relación directa entre la fosforilación de una proteína en concreto con la aparición de la relajación vascular. Sin embargo, la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en músculo liso como consecuencia de la activación de PKG ha sido ampliamente descrita (Febel et al., 1988; Cornwell & Lincoln, 1989; Geiger et al., 1992; Ruth et al., 1993). Este efecto podría explicar la vasodilatación. Se han propuesto varias causas posibles de esta disminución del calcio en el citosol. Por un lado, se ha propuesto que la inhibición del receptor de  $IP_3$  por fosforilación inhibiría el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por agonistas (Lincoln et al., 1995; Tertyshnikova & Fein, 1998). También se ha sugerido que la PKG I podría regular los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ , produciendo una hiperpolarización de la membrana que no permitiría una posterior entrada de  $Ca^{2+}$  vía canales voltaje-dependientes (Alioua et al., 1998; Zhuo et al., 1998). Experimentos recientes sugieren que puede haber una activación de proteínas fosfatasas relacionadas con la desensibilización al  $Ca^{2+}$  inducida por GMPc (Lee et al., 1997). La fosforilación de una pequeña proteína Heat-Shock-Related (HSP-20) podría disminuir su capacidad de interaccionar con los filamentos intermedios, modificando el efecto de contracción del músculo liso (Beall et al., 1997).

#### **4.1.b. Inhibición de la agregación plaquetaria**

El efecto antiagregante de la PKG I sobre plaquetas esta mediado por fosforilación de proteínas específicas como la VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatadores), que se fosforila en respuesta a análogos de AMPc y GMPc (Butt et al., 1994; Wang et al., 1998). El efecto del GMPc desaparece en animales que no expresan la PKG I mientras que el AMPc sigue teniendo efecto, lo cual revela que ambos nucleótidos actúan por dos vías diferentes y que una no puede suplir a la otra, es decir, el efecto del NO /GMPc/PKG es vital para evitar la agregación plaquetaria. Aunque aún no se conocen los sitios donde actúa la PKG I para inhibir la activación de las plaquetas, la acción sobre la VASP parece modular la actividad de moléculas de adhesión y, por tanto, ser responsable del efecto sobre plaquetas (Horstrup et al., 1994).

#### **4.1.c. La PKG en el sistema nervioso**

Ya se ha comentado anteriormente el papel del NO como mensajero retrógrado en el aprendizaje y, más concretamente, a nivel sináptico en el fenómeno de LTP. La implicación de la PKG en la inducción de la LTP está basada en el descubrimiento de que los inhibidores de PKG I bloquean la LTP y que los activadores de ésta la potencian (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 1995). De hecho, se han encontrado altos niveles de expresión de PKG I en neuronas piramidales del hipocampo, apoyando la idea del papel potencial de la proteína en LTP (Kleppisch et al., 1999).

Otros efectos de PKG en la neurotransmisión incluyen la regulación de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales (Meriney et al., 1994), de liberación de neurotransmisores (Akamatsu et al., 1993; Pineda et al., 1996) y de activación de canales de  $\text{K}^+$  (Furukawa et al., 1996).

La isoforma neuronal de NOS es sustrato de múltiples proteínas kinasas, incluyendo PKA y PKG (Bredt et al., 1992; Dinerman et al., 1994). La fosforilación disminuye la actividad de NOS, pudiendo este proceso servir como una retroinhibición de la ruta de señalización de la NOS.

Existen varias formas mediante las cuales la PKG puede regular las funciones celulares, siendo una de ellas a través de la actividad de proteínas fosfatasa. Se ha caracterizado como sustrato de la PKG a la DARPP-32, una proteína inhibidora de fosfatasa I. Esta proteína también es fosforilada por PKA, y se encuentra en grandes cantidades en la sustancia nigra, donde también se expresan GCs y PKG (Walaas & Greengard, 1984; Ariano et al., 1983). La DARPP-32 es fosforilada en respuesta a estímulos, entre otros, dopaminérgicos (Snyder et al., 1994) y esta fosforilación es modulada por la vía NO/GMPc (Tsou et al., 1993). El hecho de que la PKG pueda modular la actividad de proteínas fosfatasas a través de una proteína reguladora plantea la posibilidad de que la vía NO /GMPc pueda inducir, no sólo la fosforilación de proteínas, sino también modificar su defosforilación.

#### **4.2. Activación cruzada de PKA/PKG**

Dada la estrecha relación entre la PKG y la PKA, no es extraño que ambas enzimas compartan la especificidad de ciertos sustratos. En ambos casos, los dos tipos de proteínas quinasas transfieren un grupo fosfato desde el ATP a residuos de serina y treonina de proteínas que presentan una secuencia del tipo RRXSX, siendo X cualquier aminoácido. La homología existente entre los dominios funcionales de ambas enzimas permite que la PKG pueda ser activada por AMPc, aunque con una afinidad mucho menor que por el GMPc (Gill et al., 1976). La afinidad de la PKG por el AMPc se incrementa por la autofosforilación de la enzima (Landgraf et al., 1986). La concentración submáxima de AMPc que induce la autofosforilación de la PKG está cercana a la concentración de éste nucleótido cíclico en mucho tejidos. Así, por ejemplo, la elevación de los niveles de AMPc en el músculo liso conduce a una relajación mediada probablemente por la activación cruzada de PKG (Francis & Corbin, 1994b).

De la misma forma, la PKA puede ser activada por GMPc (Dills et al., 1976). La existencia de esta comunicación entre las dos vías pone de manifiesto la complejidad del estudio de los efectos de una de ellas, teniendo en cuenta que pueden afectarse elementos de la otra ruta implicada.

### 4.3. Proteínas de unión a GTP

La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia juegan importantes papeles en la señalización intracelular. Sin embargo, sólo las isoformas  $\alpha$  de las  $G_i$ , sensibles a toxina pertúsica son susceptibles de ser fosforiladas por PKG I. La  $G_{i\alpha}$  se ha relacionado con canales iónicos y con la activación del proceso mitogénico que alcanza el núcleo (Lepetre et al., 1994; Crouch & Simson, 1994). La fosforilación de esta proteína por PKA impide la separación de la  $G_{i\alpha}$  de las subunidades  $\beta\gamma$  (Imaizumi et al., 1991), pudiendo representar éste un mecanismo de acción para la fosforilación de  $G_{i\alpha}$ .

Existen otras proteínas de esta familia que también son fosforiladas por PKG, las Rap, pero se desconoce su función fisiológica.

## 5. EL GMPc Y LA SEÑALIZACIÓN CELULAR

Compuestos exógenos y endógenos, incluyendo hormonas, neurotransmisores y toxinas, producen respuestas celulares a través de GMPc. Los mecanismos bioquímicos mediadores de esas respuestas incluyen su síntesis por la familia de las guanilato ciclasas, la unión y activación de enzimas efectoras (ej. PKG), y su degradación por las fosfodiesterasas. La especificidad de las respuestas celulares a GMPc viene determinada por dominios de unión de GMPc en las proteínas diana. Existen dos tipos de sitios alostéricos para la unión de GMPc en las células eucariotas. Uno de ellos aparece en las proteínas quinasas dependientes de GMPc y AMPc, así como en los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, con gran homología de secuencia entre sí, mientras que las fosfodiesterasas reguladas por GMPc presentan el otro tipo de sitio alostérico. El resultado del incremento en los niveles de GMPc viene determinado por el tipo y la combinación de las proteínas diana y los sustratos, las enzimas encargadas de la metabolización del GMPc y su localización y organización en compartimentos dentro de la célula.

Numerosos estudios han descrito que el GMPc induce la relajación, tanto del tejido muscular liso, como de vías respiratorias e intestino (Murad et al., 1986; Katsuki et al., 1977). La relajación del músculo liso fue una de las primeras funciones fisiológicas directamente relacionada con la síntesis y acumulación del GMPc.

Los incrementos de GMPc en el músculo liso se han relacionado con la activación de proteínas quinasas y la consecuente fosforilación de numerosas proteínas musculares. El GMPc puede disminuir la actividad de la fosfolipasa C en preparaciones vasculares y cultivos de células de músculo liso y, por tanto, disminuirá la formación de inositol fosfatos, efecto mediado por la activación de PKG (Rapoport et al., 1986; Hirata et al., 1990). Estos eventos bioquímicos pueden disminuir la concentración de calcio libre en el citosol, dando lugar a una fosforilación de cadenas de miosina



disminuida, y en consecuencia a una relajación. Otros efectos interesantes regulados por el GMPc en el músculo liso serían el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  y/u otros cationes a través de la membrana y la regulación de la actividad de proteínas fosfatasas.

Otros efectos del GMPc incluyen la fototransducción en la retina, secreción intestinal inducida por enterotoxinas, inhibición de agregación y adhesión plaquetaria y efectos inducidos por péptidos natriuréticos en tejidos como el hígado, vasos sanguíneos y el cerebro, muchos de los cuales están mediados por la actividad de PKG, como se verá más adelante (Waldman & Murad, 1987).

### 5.1. Fosfodiesterasas reguladas por GMPc

La caracterización de los perfiles bioquímicos, farmacológicos y estructurales han identificado al menos 10 familias diferentes de PDEs en mamíferos. Cada miembro de estas familias contiene un dominio catalítico conservado de unos 270 aa en el extremo C-terminal. Este dominio rompe el enlace fosfodiéster, hidrolizando el nucleótido cíclico a su correspondiente nucleótido 5'-monofosfato (McAllister-Lucas et al., 1995). Todas las enzimas PDEs contienen dominios reguladores heterogéneos y funcionan como dímeros, aunque el significado funcional de este último permanece desconocido.

Las familias de PDEs 1, 2, 3 y 10 hidrolizan tanto GMPc como AMPc, mientras que las familias 5, 6 y 9 hidrolizan específicamente GMPc. La actividad de las PDEs es crucial para la señalización celular, dado que regulan las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos, afectando así las subsecuentes respuestas celulares. Las PDEs regulan las funciones cardíacas, esteroidogénesis adrenal, respuesta eréctil masculina y fototransducción (Juilfs et al., 1999). Estas enzimas se localizan en sitios específicos dentro de la célula, próximas a determinadas proteínas, modulando los niveles de nucleótidos en compartimentos específicos.

El GMPc regula la actividad de PDEs mediante tres mecanismos diferentes: a) incrementando la actividad a través de una acción de masa; b) alterando la tasa de hidrólisis de AMPc por competición con el sitio catalítico; y c) regulando la actividad enzimática por interacción directa con sitios alostéricos específicos (Turko et al., 1999).

La presencia de sitios alostéricos no catalíticos permite al GMPc regular la actividad de PDEs en diversas formas. El dominio de unión a GMPc en las PDEs 2, 5, 6 y 10 contiene dos sitios homólogos en tandem de unos 110 aminoácidos localizados en el extremo N-terminal. Contienen una secuencia de aminoácidos diferente de las quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos y canales activados por éstos, representando un tipo diferente de proteínas reguladas por el GMPc. PDE10 cataliza la hidrólisis de ambos nucleótidos cíclicos, pero su función fisiológica no está aún bien definida. PDE2 está ampliamente distribuida y es muy abundante en células adrenales bovinas, existiendo como homodímeros de subunidades de entre 100-150

kDa y catalizando la hidrólisis del GMPc y AMPc. El GMPc se une a los sitios alostéricos, estimula la actividad PDE2 e incrementa la hidrólisis del GMPc formando un mecanismo de retroinhibición que regula los niveles intracelulares de GMPc. Igualmente, el GMPc aumenta la degradación del AMPc mediada por PDE2, regulando de forma cruzada su concentración intracelular (McAllister-Lucas et al., 1993).

La PDE3 se caracteriza por ser inhibida por GMPc, provocando una menor degradación del AMPc, sustrato de esta enzima. De hecho, algunos efectos del GMPc se basan en un incremento de los niveles de AMPc, que conduce finalmente a una activación de PKA

Las propiedades específicas de las fosfodiesterasas de GMPc o de tipo 5 son que hidrolizan específicamente este nucleótido y que unen el GMPc a un sitio alostérico. Existen al menos cuatro tipos de fosfodiesterasas de tipo 5 expresadas en tejidos de vertebrados, tres de los cuales se expresan exclusivamente en células fotorreceptoras (Beavo & Reifsnnyder, 1990). El cuarto isoenzima parece estar más ampliamente distribuido en el sistema cardiovascular.

Los sitios de unión alostéricos de la PDE 5 son homólogos a los del tipo 2, pero no a los de la familia de proteínas quinasas, pudiendo estar derivados del sitio catalítico (Charbonneau et al., 1990; Shabb & Corbin, 1992). Una propiedad interesante del sitio alostérico es que la unión del GMPc es estimulada varias veces por inhibidores competitivos del sitio catalítico (Francis et al., 1980).

El hecho de que las PDEs tipo 5 unan GMPc a un sitio alostérico no-catalítico sugiere que estas enzimas también funcionan como proteínas receptoras de GMPc. Estudios realizados con la enzima purificada han demostrado que al retirar el extremo amino terminal, que contiene el sitio de unión alostérico, resulta en una activación de la enzima (Thomas et al., 1990a; b). Este hecho sugiere que el dominio amino terminal puede servir como regulador de la actividad catalítica. Así, la unión del GMPc desinhibiría la actividad catalítica de la misma forma que ocurre en la proteína quinasa dependiente de GMPc. Francis y Corbin han propuesto que el papel de este sitio de unión es permitir que la enzima sea fosforilada por PKG en el N-terminal de la molécula. La fosforilación podría alterar la asociación con otras proteínas o subunidades de la PDE, inhibiendo la hidrólisis de GMPc, o provocar la traslocación de la enzima a un compartimento diferente de la célula.

## **5.2. Canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos**

Otro mecanismo desencadenado por la elevación de los niveles de nucleótidos cíclicos en el interior celular, es la modulación de corrientes iónicas a través de canales. Los canales activados por GMPc se expresan en diferentes tipos de células. Estos canales presentan seis dominios transmembrana, incluyendo un poro de conducción de iones entre los dominios 5 y 6. Además, presentan en el citoplasma

dos dominios reguladores interactivos, formados por los extremos C y N terminales de la proteína.

Los canales de respuesta específica para un determinado nucleótido cíclico presentan un dominio en el extremo C-terminal de unión al nucleótido, homólogo al de las proteínas quinasas activadas por estos mismos ligandos (Biel et al., 1999a), residiendo la sensibilidad selectiva para los nucleótidos en las ocho láminas  $\beta$  y las tres hélices  $\alpha$  del C-terminal, al igual que en las PKAs y PKGs. Por lo tanto, aunque todos estos canales activados por nucleótidos cíclicos reconocen tanto al AMPc como al GMPc, ciertas isoformas son más sensibles a uno de ellos en particular. Características estructurales específicas de la región del poro confieren a estos canales una selectividad en su permeabilidad iónica. Aunque todos los canales de esta familia conducen iones monovalentes, son más permeables en condiciones fisiológicas a  $\text{Ca}^{2+}$  que a  $\text{Na}^{+}$ . Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de bloquear la actividad de los canales interaccionando directamente con sitios de unión de alta afinidad e indirectamente activando otras proteínas como la calmodulina.

La principal familia de canales modulados por nucleótidos cíclicos regulan el flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  en la células, y se compone de proteínas heterotetraméricas formadas por el ensamblaje de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , que se abren directamente por nucleótidos cíclicos. Sólo las subunidades  $\alpha$  constituyen canales monoméricos funcionales cuando se expresan en sistemas heterólogos (Biel et al., 1999a). Al contrario de los canales sensibles a hiperpolarización, este subtipo de proteínas presenta muy baja sensibilidad a voltaje.

Se han descrito tres tipos de subunidades tipo  $\alpha$  homólogas en células fotorreceptoras (conos y bastones), neuronas olfatorias, pancreas, hígado, testículos, ovarios, riñones, pulmón, cerebro, corazón, glándulas adrenales e intestino (McCoy et al., 1995). Las subunidades tipo 3 se han encontrado en papilas gustativas de rata, pudiendo representar moléculas cruciales en los órganos sensoriales (Misaka et al., 1997). Sólo se han identificado dos subunidades de tipo  $\beta$ , productos de un procesamiento de “corte-empalme” (Biel et al., 1999a).

Dentro de esta familia de canales iónicos, existe un tipo que es activado tanto por unión directa de nucleótidos cíclicos al canal o por hiperpolarización de la membrana plasmática (Ludwig et al., 1998;1999). Hasta el momento se han caracterizado hasta cuatro subtipos a partir de cerebro de ratón (McCoy et al., 1995). Estos canales poseen una característica estructural única en la región que forma el poro y en el cuarto dominio transmembrana, que le confieren una selectividad en cuanto a la permeabilidad de iones y una sensibilidad a voltaje respectivamente.

Se ha sugerido que las subunidades  $\beta$  actúan como reguladores internos de la actividad de estos canales, confiriéndoles propiedades específicas tales como la afinidad por AMPc (Biel et al., 1999a). Otras regiones moduladoras de estos canales

incluyen el segmento N-terminal y el péptido de unión entre el 6° dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de unión al nucleótido, que determina la afinidad del agonista y la apertura del canal, constituyendo la base de la transducción visual en los fotorreceptores y la regulación de la percepción olfatoria por AMPc (Biel et al., 1999a).

El GMPc media la fototransducción en células fotorreceptoras, conos y bastones, y regula la neurotransmisión en la retina. De hecho, los fotorreceptores representan el principal tipo celular que posee efectos GMPc/canales activados por nucleótidos cíclicos, planteándose la hipótesis de que la mutación selectiva del gen que codifica para uno de estos tipos de canales, sea la responsable de la falta de sensibilidad al color en humanos (Biel et al., 1999b).

Tanto el NO como el GMPc también incrementan la liberación de neurotransmisores en el hipocampo a través de los canales activados por nucleótidos, donde se les ha implicado en la mediación de LTP en la transmisión sináptica (Meffert et al., 1994; Arancio et al., 1995).

## **6. APOPTOSIS**

El proceso apoptótico se considera actualmente como un hecho normal que forma parte del desarrollo del sistema nervioso, pudiendo jugar un importante papel en las patologías neurodegenerativas y el envejecimiento. Las evidencias de que se dispone en la actualidad indican que la supervivencia de las neuronas y su muerte son procesos altamente regulados, y dependen de un número de factores internos y externos con consecuencias vitales para el buen funcionamiento del organismo.

Kerr et al. (1972) describieron dos tipos de muerte celular, distinguiendo entre “necrosis”, que está causada por un daño y provoca inflamación del tejido, y la otra denominada “apoptosis”, que aparece de forma normal durante el desarrollo. Estos autores describieron los cambios morfológicos que tienen lugar en el proceso de muerte celular, tales como el encogimiento de la célula, permeabilización de la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Estos cambios contrastan con los acaecidos cuando la muerte celular está causada por sustancias tóxicas, trauma e isquemia, donde las células y sus orgánulos tienden a hincharse llegando a romperse por el proceso conocido como necrosis. A partir de estos descubrimientos, se postuló que las células tienen la capacidad de autodestruirse por activación de un programa suicida intrínseco de la célula cuando no son ya necesarias o han sufrido un daño importante. Este relevante proceso fisiológico se describió como apoptosis. Los cambios morfológicos que se desarrollan en la necrosis y apoptosis están bien definidos en diferentes sistemas celulares (Tabla 2).

**Tabla I.2. Características de los procesos de muerte celular**

<b>Necrosis</b>	<b>Apoptosis</b>
Pérdida de homeostasis celular	Sin modificaciones aparentes
Alteración de la permeabilidad de la membrana (pérdida de $K^+$ , entrada de $Na^+$ ; caída del potencial de membrana)	Sin cambios iniciales en la permeabilidad de la membrana
Expansión de los compartimentos citoplásmicos	Condensación del citosol
Destrucción de la mitocondria y otros orgánulos	Orgánulos intactos; formación de cuerpos apoptóticos a partir de la superficie celular
Depleción de ATP	Sin pérdida de energía
Disminución de la síntesis de macromoléculas	Activación de la síntesis de macromoléculas
Afección de las células colindantes	Afección de células individuales
Agregados de cromatina poco compactos	Aparición de agregados de cromatina altamente condensados
<b>Atrofia pasiva</b>	<b>Degeneración activa</b>

El reconocimiento de la apoptosis como un proceso fisiológico normal se debe a estudios genéticos llevados a cabo en nematodos. Se ha identificado un conjunto de genes llamado *ced*, necesarios para que el procesamiento de la célula muerta se lleve a cabo de una manera efectiva, mientras que otro miembro de esta familia, el *ced-3*, es esencial para que se produzca la apoptosis (Ellis et al., 1991; Yuan et al., 1993). La *ced-3* codifica para una cisteína-proteasa, homóloga a la enzima convertidora de interleukina-1 $\beta$  (ICE). Hasta el momento, se han identificado al menos 11 miembros de la familia CED/ICE de proteasas implicadas en la apoptosis (Chinnaiyan & Dixit, 1996; Kuida et al., 1996). Estas enzimas, denominadas caspasas, son cistein-proteasas que rompen ciertas proteínas tras residuos específicos de ácido aspártico, se encuentran como zimógenos, y son activadas por auto-degradación (Thornberry & Lazebnik, 1998); se activan unas a otras constituyendo una cascada proteolítica que desemboca en la muerte de la célula (Nagata, 1997).

Estudios anteriores han mostrado que una de las características identificativas del proceso apoptótico es la ruptura del ADN en las regiones internucleosomales, resultando la formación de una escalera de ADN constituida por fragmentos de 180-200 pares de bases o múltiplos de éstos en una electroforesis en gel de agarosa (McConkey et al., 1988; Compton, 1992). La causa de esta fragmentación en forma de escalera se ha atribuido a la activación de endonucleasas por  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  (Kyprianou et al., 1988), ADNasa I (Arends et al., 1990; Peitsch et al., 1993), o ADNasa II (Barry & Eastmann, 1993). Sin embargo, cada vez aparece con más fuerza la idea de que las características morfológicas de la apoptosis no siempre están asociadas a la fragmentación del ADN (Cohen et al., 1992), y que este proceso

también puede aparecer en células necróticas (Collins et al., 1992), haciéndose necesario un estudio morfológico simultáneo para identificar las células apoptóticas.

Se han utilizado muchos parámetros para examinar la muerte celular. Éstos incluyen las pruebas de exclusión de colorantes para comprobar la integridad de la membrana, microscopía de contraste de fase para estudiar diversas características descritas anteriormente, y el patrón de fragmentación de ADN.

Es importante puntualizar que la inhibición de la síntesis de proteínas y nucleasas previenen las características descritas para la apoptosis, conociéndose en la actualidad que tras la inducción de apoptosis es necesaria la síntesis de macromoléculas para desencadenar los procesos propuestos.

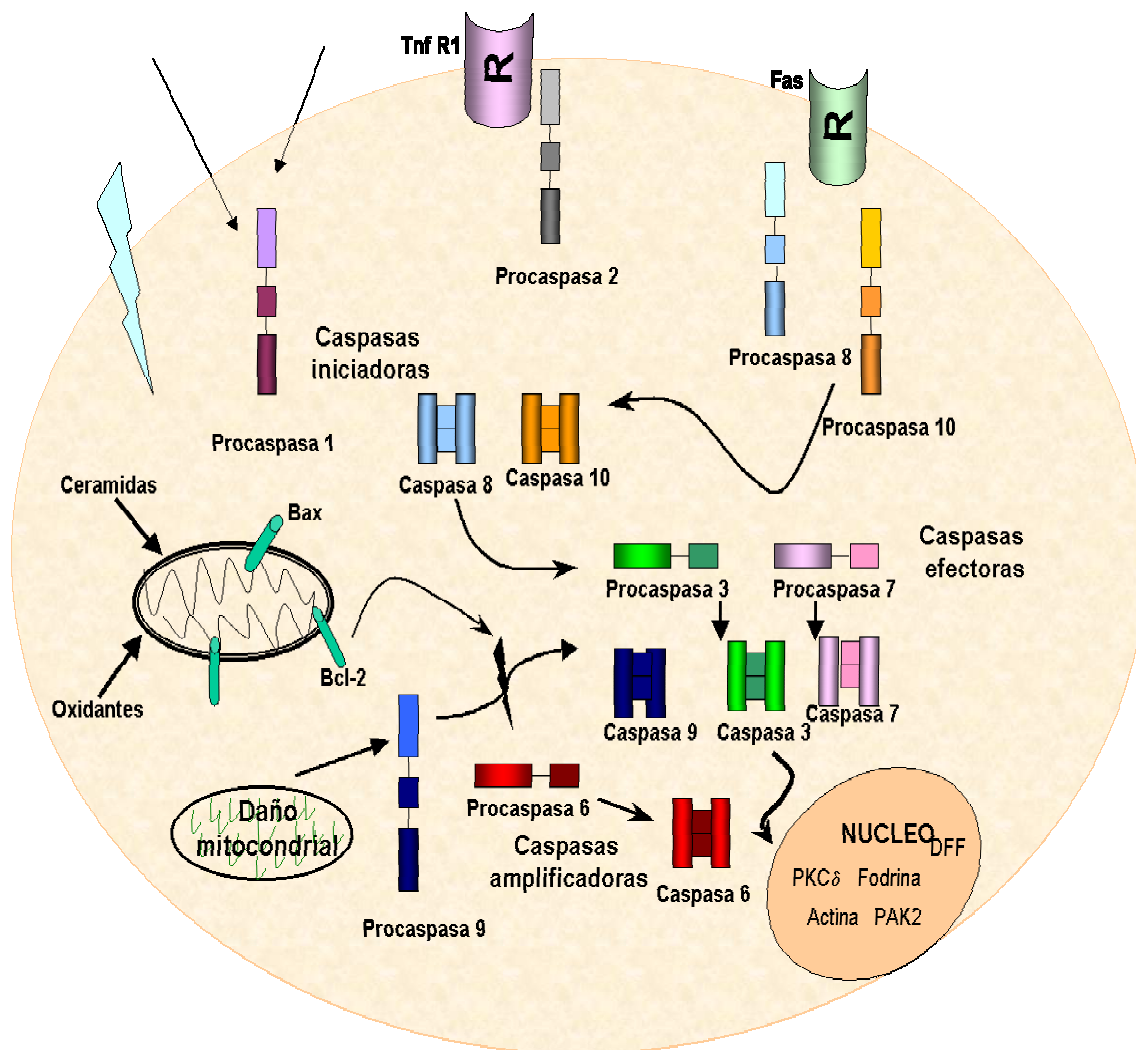
La aparición de procesos apoptóticos en el sistema nervioso central, parece estar implicado en mecanismos de adaptación durante el desarrollo del sistema nervioso (Oppenheim, 1991). La explicación general para este fenómeno es que la supervivencia de las neuronas en el desarrollo de vertebrados depende de factores neurotróficos específicos secretados por células de los tejidos que inervan las neuronas.

## 6.1 Caspasas

Se han descrito 10 tipos de estas enzimas con afinidades para diferentes sustratos. Esta familia de proteasas comparte con otras enzimas de este tipo la necesidad de sufrir una proteólisis limitada para su activación. Para las caspasas, ésta resulta de la ruptura en un segmento interdominio para dar una enzima heterodimérica, conteniendo ambas cadenas componentes esenciales de la maquinaria catalítica. A veces se libera un péptido N-terminal que no es necesario para esta actividad enzimática. El papel de este péptido sólo se conoce en el caso de las caspasas 1 y 8, donde se comporta como un dominio de interacción que modula la actividad. La estructura tridimensional de las caspasas 1 y 3 revela dos heterodímeros que interactúan vía las cadenas cortas, dando lugar a moléculas con dos sitios activos. Presentan un bolsillo de reconocimiento (S1) adaptado para aceptar un residuo Asp del sustrato. Otros bolsillos (S<sub>2</sub>-S<sub>4</sub>) confieren a las distintas caspasas la especificidad por el sustrato.

Las caspasas no son las únicas enzimas que participan en la apoptosis, ya que también las nucleasas y proteínas quinasas pueden estar implicadas, pero son absolutamente necesarias para producir los bien definidos eventos que caracterizan este tipo de muerte celular.

Las caspasas implicadas en apoptosis se dividen en iniciadoras y ejecutoras, aunque el orden en que se produce la activación de estas enzimas no siempre es igual en diferentes procesos apoptóticos. En la figura se propone la secuencia de activación de las caspasas para inducir apoptosis.



**Esquema I.15. Cascada de activación de caspasas.** Tomado de Wallach, 1997; Ellis et al., 1991; Martins et al., 1997.

## 6.2. Inducción de apoptosis

Existe una amplia variedad de compuestos que inducen apoptosis en el SNC. Entre ellos, podemos destacar cómo la desaparición del factor neurotrófico NGF (del inglés “nerve growth factor”) del medio celular da lugar a la aparición de apoptosis en neuronas simpáticas, sensoriales y motoneuronas; lo mismo ocurre al retirar el suero o la insulina en determinados tejidos neurales. Por el contrario, algunos de los llamados factores neurotróficos inducen apoptosis al entrar en contacto con algunos tipos de neuronas (Yokoyama et al., 1997).

La disminución de la concentración de  $K^+$  en el medio de cultivo resulta en apoptosis de neuronas cerebelares (Enokido et al., 1997; Shimoke et al., 1998). De la misma

forma, un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico también induce la muerte neuronal (Wei et al., 1998). Algunos compuestos moduladores de la fosforilación de proteínas, como el ácido okadaico, son capaces de producir apoptosis; agentes que provocan daños en el ADN celular, aminoácidos excitatorios como el glutamato y el ácido kaínico, la dopamina, algunos péptidos, el estrés oxidativo, lípidos como las ceramidas y el ácido retinoico, irradiación, sustancias neurotóxicas, e incluso el NO, son agentes causantes de la muerte por apoptosis (ver rev. Sastry et al., 2000).

En cuanto a este papel del NO en la inducción de apoptosis, actualmente se ha aceptado una doble acción de éste radical sobre el proceso.

### **6.2.a. El NO como inductor de apoptosis**

La citotoxicidad mediada por NO ha sido largamente discutida en la literatura, describiéndose algunos tipos celulares que desarrollan un proceso apoptótico en respuesta a NO, como los macrófagos, islotes pancreáticos, neuronas y timocitos (Brune et al., 1998; Kim et al., 1999). Se ha encontrado que la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN está asociada con los procesos apoptóticos desencadenados por NO. La participación del NO en la apoptosis inducida por estrés oxidativo puede deberse a que el NO reacciona con los aniones superóxido formados en estas condiciones fisiológicas, formando peroxinitritos, que constituyen un potente oxidante que induce citotoxicidad, así como apoptosis en muchos tipos celulares (Li & Billiar, 1999).

La sensibilidad a la toxicidad inducida por NO varía de forma muy significativa en diferentes tipos de células. Por ejemplo, concentraciones por debajo del milimolar de donadores de NO inducen una rápida muerte de macrófagos, mientras que no tienen efecto alguno sobre hepatocitos (Li & Billiar, 1999). Aunque los factores determinantes de la sensibilidad al NO no están bien definidos, la generación simultánea de especies reactivas de oxígeno, así como la supresión de mecanismos celulares antioxidantes, podrían modular esta sensibilidad. El daño causado por el NO sobre el ADN por desaminación, oxidación y/o ruptura de las cadenas, es otro factor que contribuye al desencadenamiento de apoptosis. La activación de la vía de las caspasas y la fragmentación del ADN han sido asociadas con este tipo de apoptosis.

### **6.2.b. El NO como supresor de la apoptosis**

Estudios recientes demuestran como el NO funciona como un potente agente antiapoptótico en linfocitos B, eosinófilos, folículos ováricos, células endoteliales y hepatocitos (Kim et al., 1999; Li et al., 1999). En general, la cantidad de NO necesaria para producir sus efectos antiapoptóticos es mucho menor que la necesaria para inducir apoptosis. Las acciones antiapoptóticas del NO se han comprobado *in vivo* en el hígado (Saavedra et al., 1997; Ou et al., 1997; Rai et al., 1998).



Los mecanismos por los cuales el NO previene de la apoptosis parecen ser múltiples. Por un lado, induce la expresión de proteínas citoprotectoras, como la hemo oxigenasa-1 y Bcl2 (Kim et al., 1995; Suschek et al., 1999). Por otra parte, se ha demostrado como el NO inactiva de forma reversible a las distintas caspasas vía nitrosilación del residuo conservado de cisteína del dominio catalítico (Li et al., 1997; Mannik et al., 1999). De hecho, la nitrosilación ha sido propuesta como un mecanismo para limitar la activación de las caspasas (Rossig et al., 1999). Además de este efecto de inhibición directa de las caspasas, el NO también previene el procesamiento proteolítico de las procaspasas, impidiendo su activación (Li et al., 1999).

### **6.2.c. Implicación de la vía del GMPc**

Como ya se ha detallado en los capítulos anteriores, numerosos efectos del NO están mediados por GMPc, sin embargo, la implicación de éste nucleótido cíclico en el proceso de la apoptosis no es un hecho consensuado. Por una parte, varios estudios han demostrado que el NO induce apoptosis vía GMPc (Shimojo et al., 1999; Loweth et al., 1997; Suenobu et al., 1999), mientras que en otros trabajos realizados en linfocitos B, eosinófilos, neuronas y folículos ováricos, se ha visto que la prevención de la apoptosis está mediada por GMPc (Kim et al., 1999). Aunque la PKG parece ser el sistema efector del proceso antiapoptótico, también podría estar implicada la PKA.

## **7. MODELOS CELULARES**

### **7.1 Células cromafines de médula adrenal**

Las células cromafines son responsables de la síntesis, almacenamiento y liberación de adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo durante la estimulación del sistema nervioso simpático. Esta característica justifica que sean estudiadas como modelo neuroendocrino, así como desde el punto de vista de la Neurociencia, dadas las importantes similitudes que presentan respecto a las neuronas adrenérgicas.

A principios de siglo se describió que la glándula adrenal estaba innervada por terminales nerviosos colinérgicos y que es la acetilcolina liberada por estos nervios la que constituye el estímulo primario para la liberación de catecolaminas por las células cromafines (Feldberg et al., 1934). La acetilcolina se une a receptores nicotínicos y produce una despolarización de la membrana plasmática, apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y estimulación de la secreción (Douglas et al., 1967a;b).

La médula adrenal constituye la parte interna de la glándula adrenal, y es responsable de la respuesta simpática de liberación de adrenalina y noradrenalina. El origen

embrionario de las células cromafines de la médula adrenal es particularmente importante, dado que sus células progenitoras migran durante el desarrollo desde la cresta neural del ectodermo hasta la parte interna de la glándula adrenal en desarrollo. La cresta neural constituye un grupo de células de desarrollo transitorio, que surgen de la región dorsal del tubo neural y que rápidamente migran y se dispersan en diferentes rutas, para dar lugar a los nervios simpáticos postganglionares o a las células cromafines de la médula adrenal, así como a células de Schwann y melanocitos. Los factores humorales que estas células encuentren durante su migración, determinan el destino final de su fenotipo. Así, los glucocorticoides producidos por el otro tipo celular que forma la glándula adrenal, la corteza, originan dos efectos vitales para la diferenciación de los precursores hasta células cromafines. Por un lado, previenen la diferenciación de las células cromafines a neuronas simpáticas postganglionares, y por otro, inducen la expresión en un alto porcentaje de las células de la enzima responsable de la transformación de noradrenalina en adrenalina, la feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) (Unsicker, 1993).

Una de las similitudes existentes entre las células cromafines y las neuronas postganglionares, consecuencia de su origen embriológico común, es que, tras la diferenciación celular, pierden la capacidad de multiplicarse (Tischler et al., 1993).

La médula adrenal forma parte del sistema nervioso simpático, en el que las células postganglionares no emiten axones hacia los órganos diana, sino que vierten las neurohormonas al torrente sanguíneo.

Durante el periodo final del desarrollo embrionario, terminales nerviosos de neuronas preganglionares alcanzan la médula y establecen contactos sinápticos con las células cromafines. La mayoría de estas fibras preganglionares entran en la glándula por el nervio esplácnico torácico superior. Estudios anatómicos han descrito como cada neurona preganglionar debe controlar al menos 750 células cromafines en lo que se ha venido a llamar “unidad secretora” (Marley & Prout, 1965; Tomlinson & Coupland, 1990).

Los nervios simpáticos y la médula adrenal se complementan, e incluso pueden llegar a sustituirse mutuamente en cuanto a su función fisiológica de estimulación. Sólo una pequeña proporción de células del organismo está inervada por fibras simpáticas, por lo que la liberación de adrenalina y noradrenalina a partir de la médula adrenal permite una estimulación indirecta de estas células no inervadas directamente (Guyton, 1988).

La médula adrenal está formada, además de las células cromafines, por células ganglionares, células de soporte (de Schwann para fibras nerviosas y las llamadas sustentaculares rodeando a las células cromafines), así como fibroblastos, mastocitos,

linfocitos y las células endoteliales de los vasos (Coupland, 1865; Kobayashi & Coupland, 1993).

Las células cromafines tienen apariencia poligonal, presentando el núcleo desplazado hacia un polo de la célula, mientras que el polo opuesto contiene la mayor parte de unas vesículas especializadas en almacenar las catecolaminas, los gránulos cromafines. Aunque suelen ser muy homogéneas en cuanto a su morfología, existen dos tipos bien diferenciados de células, según presenten o no la enzima PNMT, hecho que determinará que las células transformen la noradrenalina en adrenalina. Así, se distinguen células adrenérgicas y noradrenérgicas, según produzcan, almacenen y secreten uno u otro compuesto (Eränko, 1952; 1955). Se ha descrito un control neural diferente para las células adrenérgicas y noradrenérgicas (Folkow & von Euler, 1954). Además, fisiológicamente diferentes estímulos promueven una secreción diferencial de adrenalina y noradrenalina, ya que las células de uno u otro tipo presentan diferentes receptores para sustancias que estimulan la médula por vía sanguínea (Núñez et al., 1995; Vollmer, 1996).

Una célula cromafín puede contener hasta 30.000 gránulos, cuya composición química incluye, además de catecolaminas en una concentración de hasta 0,6 M, ADP, proteínas, péptidos, lípidos, calcio, y ATP en una concentración 0,15 M (Winkler, 1976; Miras-Portugal et al, 1994). La concentración extraordinariamente alta de catecolaminas que se acumulan en el interior de los gránulos cromafines es consecuencia de una síntesis muy efectiva en estas células. La síntesis de catecolaminas constituye una compleja secuencia de reacciones químicas catalizadas por diferentes enzimas, que culmina en la producción de adrenalina y noradrenalina partiendo del aminoácido tirosina. La regulación de esta compleja secuencia de reacciones enzimáticas recae en la primera de las enzimas de la ruta, la tirosina hidroxilasa.

El potencial de membrana de las células cromafines en reposo se ha estimado que es de 50 mV (Artalejo, 1995; Calvo et al, 1995). Como las neuronas, este potencial de membrana es una consecuencia directa de la acción electrogénica de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que acumula  $\text{K}^+$  en el interior de la célula a la vez que excluye  $\text{Na}^+$ , así como de un flujo de  $\text{K}^+$  a través de canales abiertos en reposo.

Las células cromafines son eléctricamente excitables, mostrando potenciales de acción con características similares a los descritos en axones neuronales (Biales et al., 1976; Brandt et al, 1976). La despolarización de las células se produce cuando la acetilcolina liberada por las neuronas preganglionares interacciona con receptores nicotínicos de membranas de las células cromafines. Las aproximaciones experimentales se realizan mediante despolarización con alto  $\text{K}^+$  o con veratridina, suponiendo la participación en mayor o menor medida de diferentes canales iónicos de la membrana.

Como resultado de los estudios de “patch-clamp”, se han descrito en células cromafines hasta 15 canales iónicos diferentes, que contribuyen a las propiedades eléctricas de las células tanto en reposo como tras la estimulación con diferentes secretagogos (Artalejo, 1995).

Los receptores de acetilcolina o receptores colinérgicos se clasifican en nicotínicos y muscarínicos, siendo los primeros de tipo ionotrópico, responsables de respuestas sinápticas rápidas, y metabotrópicos los segundos, pasando su acción biológica por una ruta de señalización intracelular (Nicholls et al., 1994). El receptor de tipo nicotínico es un pentámero compuesto por cuatro subunidades diferentes, que conforman un cilindro alrededor de un poro central hidrofóbico, cuya apertura se activa por unión del ligando a la subunidad  $\alpha$ . Existen distintas formas de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , hecho que determina el diferente comportamiento de los receptores nicotínicos de tipo muscular y neuronal. A este último tipo pertenecen los receptores nicotínicos presentes en las células cromafines (Criado et al., 1992). Estos canales activados por acetilcolina son capaces de permear tanto iones  $\text{Na}^+$  como  $\text{Ca}^{2+}$  (Nooney et al., 1992), y se desensibilizan en presencia sostenida del agonista (Callewaert et al., 1991), existiendo péptidos que modulan negativamente las corrientes nicotínicas mediante un incremento en la velocidad de desensibilización (Artalejo, 1995).

Entre los canales iónicos encontrados en células cromafines podemos destacar los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje. Estos canales amplifican la despolarización iniciada por la activación del receptor nicotínico cuando la estimulación se realiza con dosis bajas de acetilcolina, mientras que a dosis altas del ligando se activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y se inactivan los de  $\text{Na}^+$  (Kidokoro & Ritchie, 1980).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje representan el modo más eficaz de estimular la entrada de calcio, iniciando así la secreción de catecolaminas en las células cromafines. Diversos estudios han descrito en las células cromafines bovinas al menos cuatro tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes: L, N, P y Q, caracterizando a cada uno de ellos por el bloqueo de la corriente de calcio con diferentes drogas ó toxinas (revisiones Spedding & Paoletti, 1992; Dunlap et al., 1995). Todos estos canales pertenecen al grupo denominado “canales activados por alto voltaje”, caracterizándose por experimentar en mayor o menor medida todos ellos una inactivación por despolarización sostenida (Artalejo, 1995).

Un tercer tipo de canales iónicos, los de  $\text{K}^+$  activados por voltaje, participan en la regulación del potencial de membrana en reposo y en potenciales de acción, controlando la excitabilidad de las células. En células cromafines se han identificado varios de estos canales, algunos de los cuales están implicados en la repolarización de la membrana y otros en la hiperpolarización de la misma.

Los distintos canales iónicos descritos participan en la despolarización inducida por estímulos de secreción. Los estímulos secretores, como la acetilcolina, producen una despolarización de la membrana celular que se traducen en un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , conduciendo finalmente a la exocitosis del contenido de los gránulos cromafines.

La acción biológica de células como las neuronas, células neurosecretoras y endocrinas, precisa de la exocitosis de vesículas especializadas en respuesta a estímulos específicos, lo que se conoce como exocitosis regulada, y que se caracteriza por requerir el incremento en  $[Ca^{2+}]_i$ . Este proceso utiliza esencialmente el mismo mecanismo que la secreción constitutiva, pero con componentes reguladores adicionales (Burgoyne & Morgan, 1993).

La exocitosis de células neuroendocrinas como las cromafines se produce en una escala de tiempo de 50ms-1s, de forma mucho más lenta que la liberación de neurotransmisores.

### **7.1.a. Rutas de 2º mensajeros**

Se han descrito en las células cromafines receptores para un gran número de agentes hormonales como la histamina, el ATP, adenosina, GABA, péptidos, endotelina, dopamina, etc... (revisión de Burgoyne, 1991). La interacción de estas sustancias con sus receptores a nivel de la membrana plasmática de las células, produce una modulación de la respuesta secretora a través de distintas rutas de 2º mensajeros.

Las proteínas G están implicadas en la transducción de señales biológicas desde los receptores a nivel de membrana, hasta enzimas efectoras a nivel intracelular o canales iónicos (revisión Nicholls, 1994). Dentro de las células cromafines, las proteínas G están implicadas en la autoinhibición de la secreción por los productos secretados (Albillos et al, 1996; Currie & Fox, 1996) y en la activación de canales catiónicos en células cromafines de algunas especies, contribuyendo a la despolarización de la membrana plasmática (Inoue & Imanaga, 1995).

El calcio, además de su efecto en la secreción, activa rutas de señalización intracelular como las señales mediadas por PKC y por la calmodulina, proteína ligante de  $Ca^{2+}$  (Burgoyne, 1991). Respecto a esta última, ya se ha descrito su capacidad de activación de las enzimas NOS. También es importante mencionar la activación de proteínas quinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, que a su vez están implicadas en procesos como la fosforilación de la enzima TH, regulando la síntesis de catecolaminas.

Otro efecto mediado por la  $Ca^{2+}$ /calmodulina es la activación de una adenilato ciclasa sensible a este complejo, identificada en células cromafines (LeDonne & Coffee, 1980; Anderson et al., 1992). Los incrementos de los niveles de AMPc inducen una fosforilación de sustratos protéicos por PKA, que también fosforila a la

enzima TH (Haycock, 1993). Respecto a los efectos del AMPc sobre la respuesta secretora, se han descrito efectos contrapuestos, por un lado inhibitorios según lo descrito en los trabajos de Morita et al. (Morita et al., 1991), y por otro estimulatorios, describiéndose un efecto facilitador por el grupo de Artalejo et al. (Artalejo et al., 1994).

En cuanto al GMPc, Aunis et al. describieron en 1978 la existencia de una ruta de 2º mensajeros en las células cromafines basada en el GMPc. Este grupo detectó una actividad enzimática tanto en fracciones solubles como particuladas de la médula adrenal bovina (Aunis et al., 1978). Otros autores describieron posteriormente como algunos secretagogos, entre ellos la acetilcolina (Nakaki et al., 1988) y el óxido nítrico gas (Dohi et al., 1983), eran capaces de incrementar los niveles de GMPc intracelular.

Los péptidos natriuréticos, descritos como ligandos de las guanilato ciclasas de membrana, son sintetizados, almacenados y liberados a partir de las células cromafines (Okazaki et al., 1989; Niina et al., 1996).

En cuanto a los elementos de la vía NO/GMPc objeto de este estudio, se ha descrito la producción endógena de NO en preparaciones citosólicas de la glándula adrenal bovina, siendo éste capaz de activar a la GCs presente en la preparación (Palacios et al., 1989). Se ha identificado la presencia tanto de la enzima NOS tipo I como de la PKG I en las células cromafines (Rodríguez-Pascual et al., 1996).

## **7.2. Células endoteliales**

Otra fracción de las células que conforman la médula adrenal son las endoteliales, que constituyen las paredes de los vasos sanguíneos de la médula adrenal, incluidas dentro de lo que se conoce como microvasculatura. La elevada vascularización de la médula adrenal proporciona una vía rápida de salida hacia la circulación general o sistémica del cocktail hormonal secretado por la glándula (Coupland & Selby, 1976). Las células endoteliales disponen de un sistema de transporte de catecolaminas (Banerjee et al., 1985).

Actualmente, es bien conocido que las células endoteliales son capaces de generar una respuesta ante estímulos con propiedades vasoactivas, respondiendo mediante la generación de incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Weintraub et al., 1992), lo que conlleva la producción y liberación de diferentes sustancias paracrinas con capacidad para relajar o para contraer las células de la musculatura lisa vascular (Newby & Henderson, 1990; Graier et al., 1994). Entre los factores liberados por las células endoteliales con actividad relajante destaca el óxido nítrico (Kelm et al., 1988; Rosenblum, 1992). En cuanto a las sustancias con actividad vasoconstrictora, las células endoteliales liberan las llamadas endotelinas, una familia de péptidos que incrementan la  $[Ca^{2+}]_i$  lo que resulta en una potente vasoconstricción (Yanagisawa et al., 1988; Furchgott & Vanhoutte, 1989). Además de las acciones vasomotoras, los

factores liberados por las células endoteliales pueden interaccionar con las células cromafines vecinas y modular la secreción de catecolaminas (Ohara-Imaizumi & Kumakura, 1991; Torres et al., 1994; Rodríguez-Pascual et al., 1996).

## 1.MATERIALES

### Productos

Los materiales utilizados en este trabajo de investigación fueron de las siguientes casas comerciales.

Los plásticos de cultivo utilizados fueron: botellas de 75 cm<sup>2</sup> de FALCON, multiplacas de 24 pocillos (2 cm<sup>2</sup>/pocillo) y de 6 pocillos (5.5 cm<sup>2</sup>/pocillo) de COSTAR

Como anticuerpos se han utilizado:

Primarios:

-anti-GCs subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ , anticuerpos policlonales de conejo generados frente a las subunidades  $\alpha$  (GCpep8) y  $\beta$  (GCpep3) de GCS en el laboratorio de la Dra. Doris Koesling del Departamento de Farmacología de la Universidad Libre de Berlín (Alemania) de acuerdo al método descrito por Guthmann et al. (1992).

-anti-GCs policlona de conejo específico para la subunidad  $\beta$  de CAYMAN y CALBIOCHEM.

-anti- $\alpha$  actina (20-33) de conejo de SIGMA.

-anti-pSer (clon 4A9) monoclonal de ratón y anti-pThr (1E11) monoclonal de ratón fueron de BIOMOL.

-anti-pTyr-HRP (3B12) monoclonal de ratón de Amersham.

Secundarios:

-anti-IgG TRITC, anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) de SIGMA.

-anti-IgG HRP, anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) de AMERSHAM.

-anti-IgG de ratón generado en cabra y ligado a agarosa de SIGMA.

-anti -IgM de raton generado en cabra y conjugado a peroxidasa (HRP) de PIERCE.

Controles negativos:

-suero normal de conejo de SIGMA.

Controles positivos:

-fosfoproteínas aisladas de músculo de conejo, específicas para anticuerpos de pSer.

Los kits para radioinmunoensayo de GMPc, las películas fotográficas Hyperfilm- $\beta$ max (18x24 cm) y los casetes para autorradiografía (18x24 cm), así como el complejo de peroxidasa biotinilada-streptavidina, los reactivos para ECL (Enhanced Chemoluminescence Western blotting), las membranas de PVDF para inmunotransferencia Hybond ECL y las películas Hyperfilm-ECL fueron de AMERSHAM. EL sustrato quimioluminiscente Super Signal fue de PIERCE. Las membranas Centricon-30 para concentrar proteínas fueron de AMICON. El colágeno



aislado de placenta bovina fue de BIOCHROM. Los análogos permeables de GMPc,  $\beta$ -fenil-1,N<sup>2</sup>-eteno-8-bromoguanosina 3':5'-monofosforotioato cíclico, isómero Rp (Rp-8-Br-PET-GMPcS) y  $\beta$ -Fenil-1,N<sup>2</sup>-eteno-8-bromoguanosina,3',5'-monofosforotioato cíclico, isómero Sp (Sp-8-Br-PET-GMPcS), fueron de BIOLOG. El  $\beta$ -mercaptoetanol, dodecilsulfato sódico (SDS), glicina, los patrones coloreados (rango 4-250 kDa) para electroforesis, la acrilamida y bisacrilamida, TEMED y persulfato amónico empleados para preparar los geles para electroforesis fueron de BIO-RAD. También fue de esta compañía el reactivo de ensayo de proteínas basado en la detección espectrofotométrica del complejo proteína-Azul de Coomassie Brillante G-250 (Bradford, 1976). La collagenasa (EC.3.4.24.3) de *Clostridium histolyticum*, HEPES, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, análogo permeable de GMPc 8-bromo-GMPc (8Br-GMPc), el BSA fracción V y la RNasa T1 fueron de ROCHE-BOEHRINGER MANNHEIM. El Acido Okadaico, NECA, Cipermetrina, Caliculina A, los inhibidores de proteínas quinasas N-[2-(metilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-8), N-[2-((p-bromocinamil) amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), KT-5823, el péptido inhibidor de caspasa 3 (DEVD-CHO) y glutation-monoetilester fueron de CALBIOCHEM. El medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) y el suero bovino fetal normal o inactivado por calor fueron de GIBCO. Los antibióticos penicilina/streptomycin, kanamicina y anfotericina fueron de ICN o GIBCO. Las soluciones de revelador y fijador GBX para autorradiografías fueron de KODAK. El azul Tripán, ácido tricloroacético, ácido ascórbico, ácido perclórico y el detergente Triton X-100 fueron de MERCK. El kit de viabilidad celular Live/Dead Viability/Citotoxicity, el tinte para ADN SYBR-Gold, el Pico Green, el RiboGreen<sup>TM</sup> RNA Quantitation Reagent, la solución de montaje para inmunos Prolong Antifade kit y el SNAP fueron de MOLECULAR PROBES. El kit de extracción de ADN fue de TAKARA. El kit de extracción de ARN RNAeasy Midi kit fue de QUIAGEN. El kit de RT-PCR utilizado fue Access RT-PCR System de PROMEGA. El kit SYBR<sup>R</sup> Green PCR Core Reagents fue de PE BIOSYSTEMS. El péptido natriurético de tipo C fue de PENINSULA. Los donadores de NO SPER/NO, DETA/NO y DEA/NO, así como el YC-1 fueron de ALEXIS. La solución de Percoll fue de PHARMACIA. La urografina empleada en los gradientes de densidad para purificar células cromafines fue de SCHERING. El CO<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub> líquido fue de la compañía SEO. La albúmina de suero bovino, el detergente Tween-20, rojo neutro, citosina arabinofuranósido, fluorodeoxiuridina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), los ácidos etilendiamino tetraacético (EDTA) y etilenbis(oxietileno nitrilo) tetraacético (EGTA), los inhibidores de proteasas leupeptina y pepstatina, el detergente Nonidet P40, azul de bromofenol, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), gelatina-glicerol, toxina pertúsica de *Bordetella pertussis*, nitroprusiato sódico (SNP), acetilcolina, L[butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), fenol y cloroformo fueron de SIGMA. El inhibidor específico de la guanilato ciclasa soluble 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) fue de TOCRIS-COOKSON. La agarosa fue de Pronadisa. Otros reactivos y materiales de carácter general no indicados en esta extensa lista fueron de grado analítico.

### **Instrumental general**

A continuación se detalla una lista de aparatos de carácter general que se han empleado en la realización de este trabajo de investigación.

Para las centrifugaciones se emplearon las siguientes centrífugas:

Centrífuga de mesa de baja velocidad Omnifuge 2.0 RS Heraeus para la obtención y lavado de células cromafines bovinas.

Para la purificación de células cromafines en gradientes de densidad se empleó una centrífuga preparativa refrigerada Sorvall RC-5C.

En la mayoría de los experimentos se usaron microfugas para tubos Eppendorf de Beckman y Heraeus.

Todas las tareas realizadas bajo atmósfera estéril se efectuaron con campanas de flujo laminar vertical Gelair modelos Twin 30 y TC 48 de Flow. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador Heraeus termostatzado a 37°C y con flujo controlado de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los materiales de cultivo se esterilizaron mediante autoclaves Autotester-G de Selecta (alta capacidad) o Certoclav (baja capacidad). Los medios de cultivo se esterilizaron por filtración empleando una bomba peristáltica Millipore y membranas Acrocap de 0,2 µm de tamaño de poro (Gelman Sciences).

Para la perfusión de las glándulas adrenales bovinas se emplearon 2 bombas peristálticas LKB de Pharmacia con 3 canales cada una permitiendo la perfusión simultánea de 6 glándulas.

Para el conteo de células se utilizó un microscopio óptico Leitz HM-Lux3. Para la observación de los cultivos celulares se dispuso de un microscopio de contraste de fases Wilovert.

La adquisición directa de imágenes de quimioluminiscencia y de los geles de DNA marcados con tintes específicos se realizaron con el sistema de Bio-Rad Fluor-S Multimager.

Los estudios de inmunofluorescencia se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse TE 200 acoplado a una cámara Slow Scan Cool CCD Chamera Hamamatsu 4880-80 con los filtros B-2A FITC para calceína y G-1B TRITC para el homodimero de etidio.

Las suspensiones celulares se sonicaron en un sonicador Ultrasonic Braun Labsonic.

La radiactividad procedente del β <sup>3</sup>H se cuantificó en contadores de centelleo líquido Beckman LS 3801 y LS 6000 IC.

Las medidas de determinación de proteínas se realizaron en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec III. Para la determinación fluorimétrica de catecolaminas se empleó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B controlado por ordenador y con baño termostatzado modelo Frigomix U.

Para los experimentos previos de RT y PCR se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin Elmer, y para los experimentos de cuantificación se empleó el ABI Prism<sup>R</sup> 7700 Sequence Detector y el software asociado de Applied Biosystems.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y la inmunotransferencia se realizaron empleando el sistema Hoefer miniVe de Amersham Pharmacia alimentado con una fuente modelo EPS 601 también de Amersham Pharmacia. El análisis cuantitativo de los autorradiogramas se realizó empleando un densitómetro Molecular Dynamics empleando el programa ImageQuant perteneciente al Instituto de Bioquímica (C.S.I.C.)-Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Para las incubaciones que requirieron condiciones controladas de temperatura se emplearon placas calentadoras Plactronic y baños Tectron ó Unitronic 320 R de Selecta y calentador en multibloque de Lab-Line.

Cuando se necesitó aspirar medios se emplearon bombas de vacío Millipore o Eyela.

Para la preparación de disoluciones se emplearon balanzas de precisión AND ER-60 A y granatario AND FX2000, así como pHmetros Crison 2001 y Metrohm 654. Las soluciones o suspensiones se agitaron con agitadores magnéticos Agimatic-S de Selecta, orbitales Luckham 802 o para tubos Heidolph Reac 2000. El agua de alta calidad empleada para la preparación de las soluciones se obtuvo de un aparato Milli-Q Water Purification System de Millipore. Para la limpieza de todo tipo de material se empleó agua obtenida de un aparato Milli-Ro Plus también de Millipore. Una máquina Scotsman AF 10 produjo el hielo picado utilizado en muchos de los experimentos. Como cámara fría se emplearon frigoríficos de Liebherr. Para congelar se utilizaron congeladores Liebherr a -20°C y Revco a -80°C.

Las disoluciones se pipetearon empleando pipetas automáticas Gilson o Eppendorff. En el área de cultivos se emplearon pipetas de aspiración Pipetboy Acu de Integra Biosciences.

## 2.METODOS

### Obtención de células adrenomedulares

Las células cromafines se obtuvieron a partir de glándulas adrenales bovinas mediante perfusión con colagenasa (EC.3.4.24.3) y posterior purificación en gradiente de densidad según el método descrito por Miras-Portugal et al. (1985) y modificado por Wilson (1986).

Las glándulas adrenales bovinas se extrajeron de los animales unos 20-30 minutos después de su muerte. Las glándulas se mantuvieron en un medio salino (Locke de lavado) a 4°C hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

Locke de lavado (pH=7,4)	
NaCl	154,0 mM
KCl	5,6 mM
NaHCO <sub>3</sub>	3,6 mM
Glucosa	5,6 mM
HEPES	5,0 mM
Penicilina	50,0 UI/ml
Streptomicina	50,0 µg/ml
Solución de lavado + albúmina	
Locke de lavado conteniendo:	
Albúmina	2,5 g/l
Solución para perfusión con colagenasa	
Locke de lavado + albúmina conteniendo:	
Colagenasa	172,5 UI/l

Una vez en el laboratorio y aproximadamente 45 min-1 hora después de la muerte del animal, se les retiró exceso de grasa y tejido conjuntivo que rodeaba a las glándulas y se canularon a través del orificio de la vena medular central para proceder a su perfusión.

Las arterias adrenales forman un plexo subcapsular a partir del cual se dividen en dos tipos de vasos. Por un lado, las arterias corticales, que drenan la corteza, y, por otro, las arterias medulares, que cruzan la corteza sin ramificaciones y alcanzan la médula directamente. Los capilares corticales procedentes de las arterias corticales forman un plexo venoso que drena también en la médula. Por tanto, la médula recibe sangre arterial procedente de las arterias medulares y sangre venosa procedente de la corteza. Dentro de la médula, los capilares medulares convergen en la vena medular central que, por tanto, recibe toda la sangre que entra en la glándula (Vinson et al., 1985) y abandona la glándula por un ancho orificio fácilmente canulable para la

perfusión, pudiendo considerarse ésta de carácter retrógrado, puesto que va de venas a arterias.

Para favorecer el flujo de las diferentes soluciones a través de la glándula, se efectuaron pequeños cortes longitudinales en la superficie externa de las glándulas a nivel de cápsula y corteza.

Por medio de una jeringa y con objeto de eliminar la mayor cantidad posible de sangre retenida en los vasos, se introdujeron a través de la cánula varios mililitros de solución de lavado. Esta solución de lavado no contiene iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  de manera que se evita la coagulación de la sangre en los vasos, debilitándose además las uniones celulares a través de desmosomas.

Seguidamente, las glándulas se perfundieron en un baño termostatzado a 37°C bajo atmósfera estéril, en primer lugar, con solución de lavado mediante el uso de una bomba peristáltica de flujo 1,5-2 ml/min por glándula. La segunda perfusión se realizó con la misma solución de lavado a la que se había añadido albúmina de suero bovino a una concentración final de 2,5 g de albúmina/litro. La adición de esta proteína de origen bovino nos garantiza una cierta protección de las células contra las proteasas que pudieran estar siendo liberadas al medio.

Por último, las glándulas se perfundieron en circuito cerrado con 200 ml de solución de lavado conteniendo colagenasa (172,5U/litro). Debido a que la colagenasa comercial que se utiliza contiene además de colagenasa (estrictamente clostridiopeptidasa A), otras proteasas, lipasas, etc.; a esta solución de perfusión se le añadió también albúmina de suero bovino con objeto de minimizar el daño celular producido por estas otras enzimas.

El tiempo de digestión con colagenasa es de 1 hora aproximadamente. Ya que la médula adrenal es mucho más sensible que la corteza a la acción de la colagenasa, transcurrido ese período la corteza permanece intacta y, sin embargo, la médula adrenal se digiere y presenta un aspecto reblandecido, pudiendo desprenderse fácilmente de la corteza. A continuación las glándulas se abrieron longitudinalmente y, con la ayuda de un bisturí, las médulas se rasparon para obtener una papilla que contiene trozos de tejido sin digerir, matriz extracelular digerida y células adrenomedulares.

Se hizo pasar esta papilla a través de una malla de nylon de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro lavándose con solución de lavado. La solución obtenida se centrifugó en una centrífuga de mesa Heraeus de baja velocidad a 100xg durante 10 min a 20°C. El sobrenadante resultante se desechó y el sedimento conteniendo las células se resuspendió de nuevo en solución de lavado, y se pasó por otra malla de nylon de 82  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, centrifugándose en las mismas condiciones que la vez anterior. El sedimento resultante contenía las células adrenomedulares totales.

### Purificación de células cromafines y endoteliales

Se han usado 2 técnicas diferentes para purificar células adrenomedulares a partir de la suspensión inicial: 1) centrifugación isopícnica en gradiente de densidad, y 2) sembrado diferencial (Livett, 1984).

Quizás el método más utilizado es el primero y se basa en el hecho de que diferentes tipos celulares presentan diferentes densidades de flotación, de tal manera que centrifugadas en gradientes de naturaleza continua o discontinua equilibran en diferentes regiones a lo largo del tubo del gradiente.

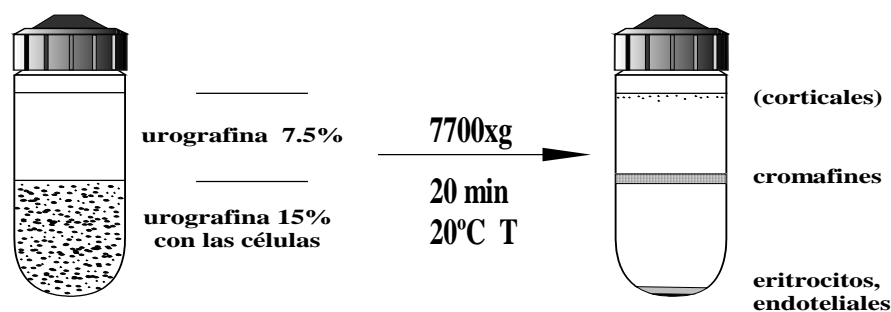
Para la separación tanto de células cromafines como endoteliales del resto de células que contaminan la suspensión inicial (eritrocitos, rara vez corticales, además de debris y otros fragmentos subcelulares) se han empleado dos medios diferentes para crear gradientes de densidad: el Percoll y la urografina (Lemaire et al., 1983; Kilpatrick et al., 1980; Role y Perlman, 1980).

#### 1. Gradientes discontinuos de urografina

El uso de gradientes discontinuos de urografina resultó ser el método que ofreció una mayor pureza en cromafines. Por esta razón, se usó este tipo de gradiente en prácticamente todos los cultivos.

Urografina es el nombre comercial de una mezcla de amidotrizoato sódico y meglumina (10:66) (p/p). La solución comercial es del 76% (p/v) en urografina y el gradiente discontinuo consta de 2 fases, 15 y 7,5% (ver esquema). Las células adrenomedulares totales se resuspendieron en la fase de urografina al 15% y sobre ella se depositó la fase al 7,5%. El gradiente se centrifugó a 7.700xg durante 20 min a 20°C en una centrífuga Sorvall rotor SS-34.

Tras la centrifugación, las células cromafines equilibran en la interfase entre las 2 bandas de urografina, mientras que endoteliales y eritrocitos aparecen como un precipitado en el fondo del tubo.



**Figura II.1. Gradiente de Urografina.** Este esquema muestra el aspecto inicial y final del gradiente de urografina utilizado para purificar células cromafines.

Se recogió la banda de células cromafines y se lavaron varias veces (al menos 2) con solución de lavado mediante centrifugaciones a baja velocidad para eliminar la urografina. Tras la última centrifugación las células se resuspendieron en 5-10 ml de medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (ver composición en la tabla que se incluye) para su posterior conteo.

Cuando las preparaciones de células cromafines obtenidas no resultaban de la pureza exigida para los experimentos (cromafines >85-90%, ver capítulo siguiente), la purificación a partir de gradientes discontinuos de urografina se combinó con la técnica de sembrado diferencial para incrementar el grado de pureza del cultivo (Unsicker & Müller, 1981). Esta técnica explota las diferencias en las afinidades que los diferentes tipos de células que componen el cultivo tienen por las superficies de plástico de las placas de cultivo. Las células cromafines, dado su origen neural, tienen una baja afinidad para adherirse a los plásticos de cultivo, necesitando, o bien un tiempo considerable para fijarse al sustrato, o la ayuda de superficies tratadas con colágeno. Sin embargo, las células que contaminan el cultivo, mayoritariamente células endoteliales, presentan gran afinidad por el plástico por lo que requieren un tiempo mucho más corto para adherirse.

Por esta razón, cuando las células cromafines son purificadas por sembrado diferencial, se resuspenden a una densidad de  $10^6$  cel/ml en medio de DMEM conteniendo 10% (v/v) de suero bovino fetal. A continuación 30 ml de esa suspensión celular se siembran en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de superficie y se mantienen en una estufa de cultivo a 37°C durante al menos una hora. Tras ese período las células endoteliales tuvieron tiempo suficiente para adherirse al sustrato, mientras que las células cromafines permanecieron flotando en el medio. Este medio enriquecido en células cromafines se retira, las células se centrifugaron a baja velocidad y se resuspendieron en medio fresco DMEM con 10% de suero inactivo (5-10 ml).

### ***Estimación del número de células. Integridad y pureza del cultivo***

La estimación del número de células, así como de su pureza en cromafines se realizó mediante conteo de las mismas en una cámara de Neubauer. Para esta determinación sólo se contaron las células vivas capaces de excluir el colorante Azul Tripán. Este colorante se preparó a una concentración del 0,5% (p/v) en una solución tamponada e isosmótica (138 mM NaCl; 48,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) según Keith y Elliot (1979). Se tomó una alícuota diluida de células cromafines resuspendidas en medio DMEM, y se mezcló con solución de colorante. Por otro lado, otra alícuota se diluyó con el colorante Rojo Neutro que en este cultivo tiñe las células cromafines de acuerdo a Stuart et al. (1974) y Role y Perlman (1980). Según estos autores, el colorante se comporta como una base débil y se acumula preferentemente en el entorno ácido de los gránulos cromafines. El colorante se preparó en condiciones isosmóticas a una concentración de 0,3 mg/ml en NaCl al 0,9 % (p/v).

Una parte de estas mezclas (células en Azul Tripán y células en Rojo Neutro) se transfirieron a la cámara y se procedió a su conteo. El número de células/campo se transforma en células/ml de acuerdo a la relación que tiene en cuenta el volumen de la cámara:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ células contadas} \times 10^4 \times \text{dilución}$$

En todas las preparaciones efectuadas para este trabajo de investigación la viabilidad estimada, es decir, el porcentaje de células que excluyeron el colorante vital Azul Tripán, fue superior al 95%.

En cuanto a la pureza del cultivo en células cromafines, generalmente fue >95%. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, cuando la pureza del cultivo fue menor de un 85-90%, las células fueron posteriormente purificadas por sembrado diferencial.

### ***Mantenimiento en cultivo***

Todo el proceso descrito para la obtención de células en cultivo primario, se realizó en condiciones de estricta esterilidad bajo una campana de flujo laminar vertical. El material utilizado (vidrio o instrumental del tipo tijeras, pinzas, mallas de nylon, puntas de pipeta, etc.) estaba previamente esterilizado en autoclave. El material de plástico (tubos de centrífuga, pipetas, superficies de cultivo, etc) se adquirió esterilizado mediante irradiación. Los medios de cultivo y disoluciones empleados fueron esterilizados mediante filtración a través de membranas Acrocap de 0,2 µm de tamaño de poro empleando una bomba peristáltica Millipore. Además, los medios de lavado y perfusión se suplementaron con antibióticos (penicilina 50 UI/ml y streptomycin 50 µg/ml).

Las células cromafines resuspendidas en medio de DMEM se diluyeron a la densidad adecuada con medio DMEM conteniendo:

Suero bovino fetal inactivado por calor	10 % (v/v)
Penicilina	100 UI/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Kanamycin	100 µg/ml
Anfotericina	2,5 µg/ml
Citosina arabinofuranósido	10 µM
Fluorodeoxiuridina (FDU)	10 µM

Aunque los cultivos utilizados fueron prácticamente puros en cromafines, la pequeña proporción (<5%) de células endoteliales que aparecieron contaminando a las primeras tras el proceso de purificación, puede llegar a convertirse en un problema debido a su alta capacidad de multiplicación. Para evitar la invasión del cultivo por



estas células, y dado que las cromafines son células de cultivo primario y no sufren divisiones, se añadieron los antimitóticos FDU y citosinarabinofuranósido. El empleo del suero inactivado frente a suero normal también dificultó la proliferación de células endoteliales debido a la destrucción en el proceso de inactivación de factores esenciales para la división de dichas células.

Las células se sembraron a densidad variable entre  $0,5-5 \times 10^6$  cel/ml en placas de cultivo de diferente formato dependiendo del tipo de experimento a realizar. Estas placas se trataron previamente con una preparación de colágeno para facilitar la adhesión de células cromafines procedente de placenta bovina, presentándose en una solución de 0,1% (p/v) de colágeno soluble en ácido. El tratamiento consiste en cubrir los pocillos de las placas de cultivo con 1 ml/ 10 cm<sup>2</sup> de área de cultivo con una mezcla colágeno-DMEM (1:1). Las placas de cultivo se incuban durante ½ hora y después se lavaron con DMEM para inmediatamente después sembrar las células cromafines.

Las células se mantuvieron en una estufa a 37°C en 95% aire/ 5% CO<sub>2</sub>. En estas condiciones, las células están perfectamente adheridas al plástico de las placas después de 24 horas. Estas células se utilizaron no mas allá del 5º día en cultivo para evitar que pudieran sufrir transformaciones que las alejaran del fenotipo que muestran en el órgano intacto. Ya que se ha demostrado que el suero contiene factores que pueden afectar sistemas de 2º mensajeros celulares, el medio de cultivo se cambió 24 horas antes del experimento por un medio que no contiene suero con objeto de minimizar las posibles influencias del suero en dicho sistema.

**Medio de Cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

<b>Componente</b>	<b>mg/L</b>
<b>Sales Inorgánicas</b>	
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200
Fe(NO <sub>3</sub> )·9H <sub>2</sub> O	0,10
KCl	400
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97,67
NaCl	6400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	125
<b>Otros componentes</b>	
D-Glucosa	1000
Rojo Fenol	15
Piruvato sódico	110
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina·HCl	84
L-Cistina·2HCl	62,57
L-Glutamina	584
Glicocola	30
L-Histidina HCl·H <sub>2</sub> O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
L-Lisina HCl	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptófano	16
L-Tirosina Na <sub>2</sub>	104,18
L-Valina	94
<b>Vitaminas</b>	
D-pantotenato Ca	4
Cloruro de colina	4
Acido Fólico	4
i-Inositol	7,20
Nicotinamida	4
Piridoxal HCl	4
Riboflavina	0,40
Tiamina HCl	400

## 2. Gradiente continuo de Percoll

Los días de cultivo en que quisieron aislarse células endoteliales además de cromafines, se sometió la papilla obtenida por digestión de la médula adrenomedular, a gradiente de densidad de percoll (Kilpatrick et al., 1980) para eliminar las células corticales, que presentan menor densidad. Para formar el gradiente se mezclaron 20 ml de solución de lavado conteniendo la suspensión celular con 20 ml de Percoll isotónico (18 ml de percoll y 2 ml de solución de lavado 10 veces concentrada) y se centrifugó en una centrífuga Sorvall con rotor SS-34 a 20.000xg durante 30 min a 20°C. Durante esta centrifugación se generó un gradiente continuo de densidad (1,04-1,14 g/l). La fracción correspondiente a una mezcla de células cromafines y endoteliales (mayoritariamente las primeras) se recogió entre las densidades 1,05-1,07 (Livett, 1984). Las células corticales quedaron en la parte superior del gradiente, mientras que los eritrocitos sedimentaron casi en el fondo del tubo a una densidad de 1,08-1,1 g/l.

La mezcla de células cromafines y endoteiales se lavó dos veces con Locke con el objeto de eliminar el percoll y se resuspendieron en un volumen conocido de medio para proceder a su conteo como ya se ha descrito.

Una vez se hubieron contado las células totales obtenidas, se procedió a la separación de ambos tipos celulares por sembrado diferencial. Durante el tiempo de cultivo las células endoteliales son capaces de proliferar aumentando su número hasta alcanzar la confluencia ocupando toda la superficie del recipiente en que se encuentren. Cuando se llega a este estado se procede al pase de éstas células para aumentar su número.

Por otra parte, las células cromafines que se habían recogido en el sobrenadante de las botellas, se sembraron en placas tratadas como ya se ha descrito en el apartado anterior.

### Pasaje de células endoteliales

Se retiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa con Locke normal sin calcio, previamente esterilizado. A continuación se añadieron 10-15 ml de solución de tripsina (tripsina 0,1%, EDTA 0,025% en Locke normal sin  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Se mantuvo en el incubador durante 2 min y se observaron al microscopio para comprobar como las células se iban desligando de la matriz y se levantaban de la superficie de la botella. Cuando fue necesario se administraron unos golpes enérgicos en el fondo de la botella para facilitar la separación de las células del mismo. La acción de la tripsina se detuvo añadiendo 10-15 ml de DMEM con suero 10%, ya que éste inhibe la acción de dicha enzima. Se recogió el medio sobrenadante conteniendo las células y se centrifugó a 100xg durante 10 min a 20°. El sedimento se resuspendió en el volumen conveniente de medio DMEM con 10% de suero para sembrarlas en pocillos o covers según conveniencia, y se utilizaron para realizar los ensayos.

**Solución de Locke sin  $\text{Ca}^{2+}$  (pH 7,4)**

NaCl	154mM
KCl	4,4mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2mM
NaHCO <sub>3</sub>	4mM
Glucosa	56mM
HEPES	10mM

Se han utilizado células del 2º pase en todos los experimentos.

**Determinación de óxido nítrico****Preparación de los donadores de NO**

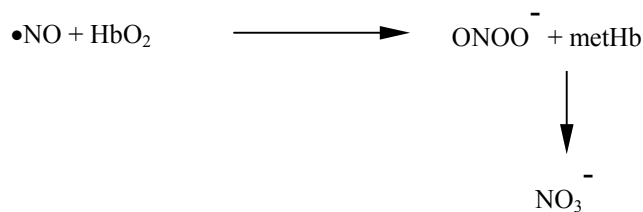
La preparación de las soluciones de los compuestos donadores de NO fueron de vital importancia dado que cada uno de estos compuestos posee unas características particulares en su capacidad de liberar NO. Así por ejemplo el SNAP se disolvió en DMSO, según especificaciones del fabricante, preparando una solución nueva cada día que se realizó el experimento, y se cuidó especialmente de proteger esta solución stock de la luz, ya que ésta incrementa de manera significativa la descomposición del compuesto, y por tanto la liberación de NO.

Los Nonoatos (DEA/NO, SPER/NO y DETA/NO) se disolvieron según se ha descrito por Keefer et al. (1996). Se prepararon soluciones stock cada día en una solución NaOH 0,01N, para evitar una descomposición espontánea del compuesto a pH neutro, lo que supondría un error en la concentración utilizada en el ensayo. Además, los compuestos sin disolver, se trataron con nitrógeno antes de cerrar el envase, para eliminar la humedad presente en el aire que puede provocar la descomposición de los mismos. La concentración de la solución stock se controló midiendo la absorbancia a 250 nm según los coeficientes de extinción molar  $8.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para SPER/NO y  $6.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para DEA/NO (Ramamurthi and Lewis, 1997), y para el DETA/NO 7.680 a 251 nm según especificaciones del fabricante.

El nitroprusiato sódico se preparó a diario disolviéndolo en tampón y protegiéndolo de la luz para evitar su descomposición.

**1. MEDIDA DE ÓXIDO NÍTRICO CON OXIHEMOGLOBINA**

Este ensayo de la hemoglobina se basa en la reacción del NO con la hemoglobina reducida ( $\text{HbO}_2$ ) según la ecuación:



La oxidación de la hemoglobina se produce de forma estequiométrica con el NO y ocurre de manera más rápida que la reacción entre el oxígeno y el NO (Hevel & Marletta, 1994). Gracias a ello, la liberación de NO se puede monitorizar midiendo la formación de metHb a 401 nm. El método original empleaba el cambio en la absorbancia que ocurría en el tiempo entre 401 y 411 nm ( $A_{401} - A_{411}$ ). En cualquier caso el punto isosbético para la conversión de HbO<sub>2</sub> a metHb ocurre a 411 nm, y no debería cambiar. Por tanto, el ensayo puede simplificarse mediante la medida del incremento de la absorbancia a 401 nm. Por otro lado también puede medirse la desaparición de HbO<sub>2</sub> por disminución de la absorbancia a 576 nm. Cuando se utilizaron concentraciones bajas del donador de NO, se midió la aparición de metHb a 401 nm. Por el contrario, cuando se utilizaron concentraciones elevadas de donadores de NO, estudiamos la desaparición de HbO<sub>2</sub> a 576 nm.

Cada vez que se preparó una solución de hemoglobina, se calculó su concentración de acuerdo con la ecuación:

$$[\text{HbO}_2](\mu\text{M}) = [1,013(A_{576}) - 0,3269(A_{630}) - 0,7353(A_{560})] \times 10^2$$

Conocida la concentración inicial de hemoglobina reducida, se calcularon los coeficientes de extinción molar para ambas longitudes de onda. Para ello se realizó un proceso de calibrado para verificar la exactitud en la medida del NO. Este proceso consiste en establecer una recta con diferentes concentraciones de HbO<sub>2</sub>, midiendo los cambios en su absorbancia antes y después de su oxidación cuantitativa a metHb, utilizando una solución de ferricianuro potásico. Así comprobamos que los cambios en la absorbancia fueron constantes y que se mantuvo una relación lineal entre la absorbancia tras la transformación total a metHb y la concentración del compuesto de partida.:  $\Delta\epsilon_{\lambda 401} = 54.346 \pm 1.727 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\Delta\epsilon_{\lambda 576} = 13.237 \pm 2.580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La estimación de la liberación de NO a partir de donadores de NO se realizó paralelamente en ausencia y presencia de células. En el primer caso diferentes concentraciones de donadores de NO se añadieron a una cubeta que contenía 500  $\mu\text{L}$  de solución tampón, en la que se incluyó una concentración de hemoglobina de 10  $\mu\text{M}$  o 70  $\mu\text{M}$  según se fuera a medir la absorbancia a 401 o 576 nm. La mezcla se mantuvo a 37°C durante los tiempos necesarios y posteriormente se leyó la absorbancia.

Para hacer el estudio dosis-respuesta en presencia de células, éstas se mantuvieron en cultivo en placas de 24 pocillos a una densidad de  $10^6$  células. Se les retiró el suero 24 horas antes de realizar el experimento para evitar que restos de éste pudieran interferir en la reacción. Inmediatamente antes del experimento se lavaron los pocillos dos veces con solución Locke eliminando así el colorante rojo fenol del medio de cultivo, cuyos máximos de absorbancia se encuentran a 390-430nm o 560-610 nm y coincidían por tanto con los de medida de la HbO<sub>2</sub> y metHb. A continuación, se le añadió al pocillo 1,5 mL del tampón con la concentración correspondiente de HbO<sub>2</sub>, se tomaron 500  $\mu$ L de este medio para medir su absorbancia a tiempo 0 y utilizar este valor como blanco de cada experimento en particular. Inmediatamente después, al medio restante con las células se le incorporó el donador de NO. Tras 10 min en el caso de DEA/NO y 15 min en el caso de SPER/NO y SNAP de incubación a 37°C, se recogieron 500  $\mu$ L y se midió su absorbancia.

A cada uno de estos valores de absorbancia se le sustrajo el obtenido al incubar el mismo tiempo la concentración utilizada de HbO<sub>2</sub> en el experimento, pero sin añadir ningún donador de NO. Esto nos permitió reducir la posible interferencia de otros mecanismos celulares incluyendo la liberación basal de NO (Schwartz et al, 1998).

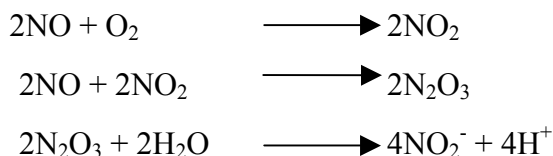
**Solución de Locke Normal (pH 7,4)**

NaCl	140mM
KCl	4,7mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2mM
ClCa <sub>2</sub>	2,5mM
NaHCO <sub>3</sub>	4mM
Glucosa	5,5mM
HEPES	10mM
EDTA	0,07mM

Para llevar a cabo el estudio en función del tiempo, las células se mantuvieron en cultivo en placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \cdot 10^6$ , se les retiró el suero 24 horas antes del ensayo y se lavaron dos veces con solución Locke. La incubación se llevó a cabo con 5,5 mL del tampón con la concentración de HbO<sub>2</sub> correspondiente, tomando 500  $\mu$ L a tiempo 0 como ya se ha descrito. A continuación se le añadió el compuesto donador de NO y a los diferentes tiempos se recogieron 500  $\mu$ L del medio de incubación y se midió la absorbancia. Igual que en el caso anterior, se hicieron medidas a los mismos tiempos con las células, pero en ausencia del donador estudiado, restándole estos valores a los obtenidos en las medidas con el donador.

## 2. Determinación de nitritos

Es bien conocido que el NO reacciona rápida y espontáneamente con O<sub>2</sub> para producir varios óxidos de nitrógeno:



De estos compuestos el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> es estable tras la descomposición del NO en solución acuosa. Por lo tanto la determinación de nitritos en solución es una forma indirecta pero muy precisa de calcular la cantidad de NO liberado en el medio.

El ensayo para la detección de pequeñas cantidades de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> según el método descrito por Misko et al.(1993) se basa en la formación de compuestos N-nitrosilados a partir de nitritos en medio ácido y la subsecuente N-nitrosilación del 2,3-diaminonaftaleno (DAN) a 2,3-naptotriazol (NAT), un derivado fluorescente del primero.

La intensidad fluorescente para el NAT es al menos 90 o 100 veces más alta que la obtenida para una concentración equimolecular de DAN cuando la solución es excitada a 375nm y la emisión se detecta al máximo para el NAT, 415 nm. El límite de detección para el NAT es menor de 10 nM, y la fluorescencia se mantiene lineal hasta concentraciones mayores de 6 μM.

Además, la cuantificación de nitritos se calibró mediante una recta patrón con estándares conocidos de nitritos.

El experimento se llevó a cabo en un mililitro de solución Locke que contenía el donador de NO a una concentración conocida y se le añadieron 100 μL de DAN a partir de un stock 0,025 mg μL<sup>-1</sup> preparado fresco en 0,62 M HCl. Tras una incubación de 15 min a 37°C se paró la reacción añadiendo 50 μL de 2,8 N NaOH. La medida de la absorbancia del NAT formado por reacción de los nitritos presentes en el medio con DAN, se realizó a λ<sub>ex</sub>=375 nm y λ<sub>ex</sub>= 415 nm.

El compuesto 2,3-diaminonaptaleno se preparó fresco cada día y se mantuvo protegido de la luz para evitar modificar sus propiedades de emisión fluorescente.

## DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Este ensayo se basa en la determinación simultanea de las células vivas y muertas por sondas que miden dos parámetros reconocidos de la viabilidad celular, la actividad esterasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática.

Las células vivas se distinguen por la presencia en el citosol de actividad esterasa inespecífica. Esta actividad se determina por la conversión de la calceína AM, análogo de calceína permeable para las células y no fluorescente, en calceína libre

intensamente fluorescente. Esta sonda es retenida por las células vivas por su naturaleza polianiónica, produciendo una fluorescencia verde intensa a las longitudes de onda Ex/em 495 nm/515 nm. Por otro lado el homodímero de etidio (EthD-1) se introduce en las células que presentan la membrana dañada, sufriendo un incremento de su fluorescencia de 40 veces por interacción con los ácidos nucleicos y emitiendo una fluorescencia roja intensa a las longitudes de onda ex/em 495 nm/635 nm. La determinación de la viabilidad celular se basa, por tanto, en parámetros físicos y bioquímicos.

Para realizar este estudio se cultivaron las células en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \cdot 10^5$  células por pocillo. Previo al ensayo se lavaron las células con solución Locke para eliminar el colorante del medio de cultivo y evitar su interferencia en el método. La incubación con las sondas se realizó en este mismo medio a una concentración  $1 \mu\text{M}$  calceína AM y  $8 \mu\text{M}$  homodímero de etidio durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ .

A continuación y sin retirar las sondas del medio, se tomaron imágenes de la fluorescencia con la cámara Slow Scan Cool CCD de Hammamatsu 4880-80 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TE 200, utilizando los filtros B-2A FITC para la calceína, y G-1B TRITC para el homodímero de etidio por ser los que presentaban los pasos de longitudes de onda más adecuados a los máximos de excitación y emisión de cada una de las sondas.

Como control negativo se introdujo un pocillo con la misma concentración de las sondas pero en ausencia de células, comprobándose que no se obtenía señal fluorescente de ninguna de las dos sustancias ya que carecen de fluorescencia sin interacción con las células.

### **Ensayo fluorimétrico de cuantificación del ADN total**

Este ensayo se utilizó para evaluar la pérdida de células cuando los cultivos se sometieron a distintos tratamientos. Las células muertas pierden la capacidad de adhesión al sustrato en caso de cromafines, o bien a la placa directamente en el caso de endoteliales, y por tanto en el lavado anterior a la extracción quedaron eliminadas del cultivo.

El ensayo fluorimétrico de ADN se basa en el aumento de fluorescencia que se produce cuando el compuesto bisbencimidazol (Hoechst 33258) se une al ADN (Downs y Wilfinguer, 1983; Labarca y Paigen, 1980). Es un método rápido y sencillo para determinaciones cuantitativas de ADN en extractos celulares, donde la cromatina se disocia mediante el empleo de un tampón de alta concentración salina para hacer totalmente accesible el ADN al agente fluorescente. El ensayo es además extremadamente sensible ya que se pueden llegar a detectar hasta 10 ng de ADN. El aumento de fluorescencia del compuesto se produce inmediatamente al entrar en contacto con el ADN y se mantiene constante durante al menos 16 horas. La reacción es lineal en un amplio rango de concentraciones de ADN.



Las células se levantaron de los pocillos donde habían sido cultivadas y tratadas con 50 µl de tampón de extracción (NH<sub>4</sub>OH 1 N; Tritón X-100 0,1%) y se les añadieron 450 µl de tampón de ADN de alta concentración salina (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 M NaCl; 10 mM EDTA; pH= 7,2). La solución se sonicó para conseguir una perfecta homogeneización y a continuación se centrifugó a 13.000 rpm. Para el ensayo se tomaron alícuotas de 100 µl del sobrenadante.

El ensayo se realizó en cubetas que contienen las muestras y el reactivo de Hoechst (200 ng/ml) en un volumen final de tampón de ADN de 2 ml. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 356 nm y una longitud de onda de emisión de 458 nm.

El cálculo de las concentraciones de ADN se realizó interpolando los valores de fluorescencia obtenidos en una recta patrón construida con ADN estándar en un rango de concentraciones de 0-1.000 ng. Este estándar se preparó a una concentración de 50 µg/ml que se comprobó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{500\text{ ng/ml}}=1$ ).

### Extracción del ADN presente en el citosol

Dado que está establecido que la fragmentación del ADN es uno de los hechos que se producen al desencadenarse la muerte celular programada o apoptosis, quisimos comprobar si aparecía una mayor cantidad de ADN en el citosol y si éste había sido degradado por la acción de endonucleasas. Para ello las células en cultivo que habían sido sometidas al tratamiento en estudio se sometieron, tras un lavado con PBS, a digestión suave, en un tampón de composición: 20 mM EDTA; 0,5% TritonX-100; 5 mM Tris-base; pH= 8. Este medio respeta la integridad nuclear de forma que permite aislar solamente los ácidos nucleicos que han salido del núcleo y que están parcialmente degradados por enzimas endonucleasas. Las células se agitaron durante 15 min en hielo en presencia de este tampón para asegurar la ruptura de las membranas citosólicas. El extracto se recogió en tubos eppendorff y se centrifugó 10 min a 14.000 xg. El sobrenadante se recogió en un tubo limpio y se añadió RNasa, previa inactivación de ADNasas contaminantes por calor, a una concentración de 0,1 mg/mL y se incubó 30 min a 37°. A continuación se añadió Proteinasa K a una concentración de 0,1 mg/mL y se incubó durante dos horas a 56° para eliminar las proteínas que pudieran existir en los extractos.

#### PBS (pH= 7,4)

NaCl	8,00 g/L
KCl	0,20 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/L

Se realizó la extracción de ADN adicionando un volumen de una mezcla fenol-cloroformo. La mezcla se agitó en el vortex y se dejó 15 min a 4° para que se separaran las dos fracciones. Tras una centrifugación de 5 min a 14.000xg, se recogió la fracción acuosa que quedó en la parte superior del tubo.

Se midió el volumen exacto de ésta fase y se precipitó el ADN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato amónico 2 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se mantuvo a -20°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 15 min a 14.000 xg y se retiró el sobrenadante, quedándonos con un precipitado muchas veces prácticamente indetectable. El precipitado se lavó con etanol 75% muy frío mediante una nueva centrifugación, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado al aire para eliminar todos los restos de etanol. Este precipitado se resuspendió en un volumen pequeño de TE y se utilizó para medir el ADN o bien para realizar una electroforesis en geles de agarosa.

### **Ensayo fluorimétrico de cuantificación del ADN citosólico**

La cuantificación del ADN citosólico se realizó con la sonda fluorescente PicoGreen, un agente que se introduce en los ADN de doble cadena sufriendo un cambio en su espectro de emisión. Este ensayo es extremadamente sensible, capaz de detectar hasta 25 pg/mL. La medida se realizó en un espectrofluorímetro a las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la fluoresceína. El rango de detección lineal del ensayo es de más de cuatro ordenes de magnitud de concentración de ADN (de 25 pg/mL a 1000ng/mL) y se mantiene en presencia de varios compuestos que suelen contaminar las preparaciones de ácidos nucleicos, como las sales, urea, etanol, detergentes, proteínas y agarosa. También está optimizado para evitar la contribución a la señal de la posible contaminación con ADN monocatenario ó ARN.

Tanto la sonda PicoGreen como las muestras se diluyeron en TE (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH=7,5) que se preparó en agua estéril y libre de ADNasas. La dilución del agente se realizó en el momento de su utilización en un recipiente de plástico ya que se puede adsorber a las paredes de cristal. Además, debe protegerse de la luz ya que es extremadamente fotosensible.

Para establecer la recta patrón se preparó una solución stock de ADN bicatenario a 200 µg/mL calculado en base a la absorbancia a 260 nm en una cubeta de 1cm ( $A_{260}=0,04$  corresponde a 2 µg/mL). Las concentraciones de la recta patrón se pueden establecer de alto o bajo rango según la cantidad que se estima obtener en las muestras.

Tanto las muestras problema como las correspondientes a la recta patrón se diluyeron en 1 mL de TE al que se añadió 1 mL del reactivo PicoGreen diluido 1:200. Las cubetas se agitaron y la fluorescencia se leyó tras 5 min de incubación a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las condiciones de lectura se fijaron a 480 nm la longitud de onda de excitación y en 520 nm la de emisión. Las ventanas se ajustaron

con el punto de la recta patrón de mayor concentración. Para minimizar los efectos de la descomposición por la luz, todas las muestras se mantuvieron el mismo tiempo antes de hacer la lectura de la fluorescencia.

Los datos se procesaron restando a cada valor obtenido el de la fluorescencia del blanco, para después construir una recta patrón e interpolar los valores de fluorescencia de nuestras muestras.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Una vez precipitado el ADN extraído del citosol y resuspendido en un volumen de aproximadamente 50  $\mu$ L de TE, una parte se mezcló con tampón de electroforesis 6 veces concentrado y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa preparado al 2%. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 50 V durante 2 horas.

Finalizada la electroforesis el ADN se tiñó con el colorante fluorescente específico para ácidos nucleicos SYBR Gold. Éste es el marcaje fluorescente más sensible de que se dispone para la tinción de ácidos nucleicos en geles. Se trata de un derivado asimétrico de la cianina, que incrementa su fluorescencia unas 1.000 veces por unión a ácidos nucleicos y presenta un alto rendimiento. El máximo de excitación para el complejo colorante-ácido nucleico es a 300 nm en ultravioleta y de 495 nm en visible. El máximo de emisión se encuentra en 537 nm.

Este compuesto penetra en los geles de agarosa gruesos o de alto porcentaje de forma rápida y no precisa de posterior lavado dada la baja emisión que presenta en estado libre.

El tinte se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  en una solución de DMSO 10.000 veces concentrada. Para su utilización se diluyó en tampón TE (ver apartado anterior) o en TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH= 7,5-8). El gel se introdujo en un volumen suficiente del tinte como para cubrirlo por completo y se incubó durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital ligera y protegido de la luz.

Inmediatamente después las bandas de ADN se visualizaron mediante transiluminación ultravioleta y se capturó la imagen obtenida mediante una cámara digital (Sistema Flúor-S de Bio-Rad).

### **Medida de la actividad de caspasas**

Se dispone de sustratos específicos para las diferentes caspasas unidos a una molécula de naturaleza fluorescente. Estos sustratos no presentan fluorescencia a menos que sean hidrolizados por las caspasas.

Según estas características del ensayo, el incremento en la emisión del compuesto fluorescente es directamente proporcional a la actividad de la caspasa estudiada, siempre que el sustrato se encuentre en el medio a concentraciones saturantes para evitar un agotamiento del mismo.

La medida de la actividad puede hacerse de forma cuantitativa mediante una recta patrón con cantidades conocidas de la molécula fluorescente libre, o bien referir los resultados a un control en el que no se ha estimulado la actividad caspasa.

Las células en cultivo se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con un tampón de composición: 1% triton X-100; 10% sacarosa; 5 mM EDTA; 2 mM DTT; 50 mM HEPES; 1 mM PMSF; Pepstatina 10  $\mu\text{g/mL}$ ; Leupeptina 10  $\mu\text{g/mL}$ ; (pH= 7,4). El extracto se centrifugó 10 min a 14.000xg a 4°C y se recogió el sobrenadante.

El ensayo se realizó en placa de 96 pocillos en un volumen final por pocillo de 100  $\mu\text{L}$  de un tampón de reacción que contiene 100 mM Hepes; 10% sacarosa; 10 mM DTT; 2 mM EDTA; 0,1% CHAPS; pH=7,4 para digerir las membranas plasmáticas. El sustrato específico de la caspasa se añadió a cada pocillo a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  y la reacción se disparó por adición del extracto. En ese momento se midió la fluorescencia y consideramos esta medida como  $t=0$ .

Tras 90 min de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz se volvió a medir la fluorescencia ( $t=90\text{min}$ ).

El incremento de fluorescencia por acción de la ruptura del sustrato por la caspasa se calculó por diferencia entre las dos medidas de fluorescencia,  $\Delta\text{Fluo.}=(F_{t0}-F_{t90})$ .

Además se incluyeron dos controles, por un lado se incubó el mismo tiempo la misma concentración de sustrato en el tampón de reacción pero en ausencia de extracto celular para comprobar que no aparecía un incremento en la fluorescencia por efecto de la luz u otro factor externo. Por otro lado, se introdujo un inhibidor específico de la caspasa en estudio en un medio que incluía tanto sustrato como extracto celular, comprobándose que no se producía incremento en la fluorescencia, garantizando así la especificidad del ensayo.

## ESTUDIOS INMUNOCITOQUÍMICOS

Para realizar los estudios inmunocitoquímicos, las células cromafines y endoteliales, se sembraron en cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente tratados con colágeno en el caso de las células cromafines, a una densidad de  $2 \cdot 10^5$  células. Una vez que las células estuvieron bien adheridas a la superficie de cultivo (2 días), se fijaron con una mezcla de acetona:metanol (1:1) muy fría durante 2 minutos. Los cubreobjetos se dejaron secar al aire y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para la detección inmunocitoquímica de los antígenos estudiados en este trabajo de investigación, las células, ya fijadas, se atemperaron durante al menos 1 hora, y se preincubaron en placas petri durante 2 periodos de 10 min en medio salino tamponado con fosfato.

Para los estudios de inmunofluorescencia, los cubreobjeto se preincubaron durante 1 hora con medio PBS + 4% (p/v) de leche deslipidizada en polvo como agente bloqueante. A continuación se dejó secar al aire unos instantes y se efectuó la incubación con el anticuerpo primario en un volumen pequeño de medio PBS-4% leche que se depositó sobre el cubreobjeto. Usualmente la incubación con el

anticuerpo primario se efectuó a 4°C durante aproximadamente 15 horas. El exceso de anticuerpo se lavó dos veces con el medio de bloqueo durante 10 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario ligado a rodamina se efectuó durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo 2° se eliminó también con 2 lavados de 10 minutos con PBS-4% leche. A continuación, las monocapas se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con el compuesto fluorescente marcador del ADN 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 1  $\mu$ M en medio PBS con objeto de visualizar fácilmente los núcleos celulares.

A continuación se montaron los cubreobjetos en portaobjetos con una gota de la solución de montaje específica Prolong Antifade Kit.

Los estudios de inmunofluorescencia se analizaron con un microscopio Nikon Eclipse TE 200 acoplado a una cámara Slow Scan Cool CCD Chamera Hammamatsu 4880-80 con el filtro G-1B TRITC específico para la rodamina.

### **Determinación de los niveles intracelulares de GMPc**

Los niveles intracelulares de GMPc se determinaron mediante un radioinmunoensayo basado en la competición entre el GMPc procedente de extractos desproteinizados de células y una cantidad fija de [ $^3$ H]-GMPc en su unión a un anticuerpo generado en conejos frente al antígeno GMPc ligado a albúmina, que reconoce específicamente al nucleótido. Transcurrido un período de incubación en el que se alcanza el equilibrio, mediante técnicas sencillas es posible separar el nucleótido libre del que está específicamente ligado a la proteína. Cuanto mayor cantidad de radiactividad permanezca unida a la proteína, significará que en el extracto de partida había menos nucleótido que compite. Comparando con una serie de tubos en los que se añadió cantidades conocidas de GMPc patrón se puede conocer con exactitud la cantidad de nucleótido cíclico en el extracto celular (Harper & Brooker, 1975).

Para esta determinación, las células cromafines se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de  $10^6$  cel/pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Previo al ensayo se cambió el medio a las células por uno sin suero 24 horas antes. Cuando la determinación se realizó en células endoteliales, éstas se sembraron en placas de 24 pocillos y se mantuvieron hasta que alcanzaron confluencia. El suero se retiró del medio 4 horas antes del ensayo. Para realizar el experimento, se retiró el medio DMEM y se lavaron los pocillos una vez con 500  $\mu$ l de solución de Locke.

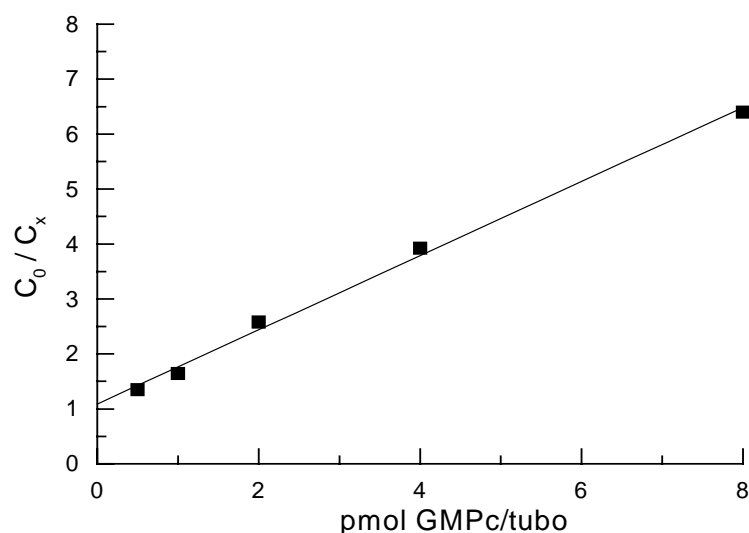
A continuación se preincubaron durante 30 minutos con el mismo medio. Dependiendo del experimento particular, este medio de preincubación contuvo diferentes agentes cuyo efecto se quiso estudiar. En general, en la preincubación y también durante el período de estimulación, al medio se le añadió 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) a una concentración final de 0.5 mM con objeto de inhibir las fosfodiesterasas y de esta manera aumentar la sensibilidad del ensayo. Durante el período de estimulación las células se incubaron con los agentes cuyo efecto sobre los niveles intracelulares de GMPc se quiere evaluar. Para terminar el período de estimulación se aspiró el sobrenadante, se añadieron a cada pocillo 300  $\mu$ L de una

solución de ácido tricloroacético (TCA) al 6% (p/v), las células se rasparon y se recogió el medio en un tubo eppendorff. Esta solución ácida precipita las proteínas y tras una centrifugación en Microfuga, el sobrenadante constituye el extracto desproteínizado. Para evitar la precipitación de la proteína de unión a GMPc, estos extractos ácidos se neutralizaron añadiendo gota a gota una solución de 3 M KOH, 1,5 M trietanolamina hidrocloreuro (TEA) hasta que la mezcla alcanzó el pH neutro según el papel indicador.

El radioinmunoensayo se realizó en un volumen final de 200  $\mu$ l, que contenía los siguientes volúmenes de las diferentes soluciones (en  $\mu$ l):

RIA-GMPc	[ $^3$ H]-GMPc	Tampón	Patrón	Extracto	Blanco	Anticuerpo
No GMPc	50	100	-	-	-	50
Patrones	50	-	100	-	-	50
Blanco	50	-	-	-	100	50
Extracto	50	-	-	100	-	50

El blanco de los ensayos consiste en un tubo que contiene una proteína que desplaza completamente al GMPc del anticuerpo. Una vez alcanzado el equilibrio, para separar el nucleótido ligado a proteína del que se encuentra libre, se precipitó el anticuerpo con una solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  al 60% (p/v). Tras una centrifugación en Microfuga el precipitado contiene el [ $^3$ H]-GMPc y GMPc frío ligado al anticuerpo. La radiactividad se determinó en cuentas por minuto (cpm) con un contador de centelleo líquido.



**Figura II.2. Calibración de las medidas de nucleótidos cíclicos.**  
Ejemplos de recta de calibrado para los ensayos del nucleótido cíclico GMPc mediante radioinmunoensayo.

El GMPc contenido en los extractos se determina por interpolación en rectas construidas tras linealización de curvas de calibrado obtenidas con los tubos "No GMPc" y los de los patrones (conteniendo de 0,5-8 pmol de GMPc). En estas rectas se representan pmol de nucleótido cíclico/tubo frente a Co/Cx siendo Co la radiactividad en cpm unida al anticuerpo en ausencia de GMPc no marcado y Cx, el valor de radiactividad unida al anticuerpo para cada extracto problema.

Tanto la preparación de los extractos celulares como la incubación con el anticuerpo se realizan a 4°C en hielo para evitar tanto la degradación del nucleótido cíclico como la desnaturalización térmica de la proteína. Además el tampón en el que se llevó a cabo el radioinmunoensayo contenía EDTA como quelante de cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que son esenciales para la actividad de fosfodiesterasas residuales que pudieran haber resistido el proceso de extracción.

Este ensayo, tal como se ha descrito, presenta una alta especificidad para el GMPc, además de una sensibilidad adecuada para las cantidades de dicho nucleótido presentes en las células.

### **Detección de la guanilato ciclasa soluble mediante inmunotransferencia**

La detección de la guanilato ciclasa soluble se realizó por técnicas de inmunotransferencia empleando un anticuerpo comercial (Calbiochem y Cayman) generado contra un péptido sintético derivado de una secuencia conservada de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de guanilato ciclasa soluble.

Las células mantenidas en cultivo en placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \cdot 10^6$  se lisaron con 300  $\mu\text{L}$  de tampón 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM PMSF tamponado con 20 mM Tris a pH 7.4 que contenía los inhibidores de proteasas: Leupeptina 10  $\mu\text{g/mL}$ , Pepstatina 10  $\mu\text{g/mL}$ , Antipaina 50  $\mu\text{g/mL}$ , Aprotinina 1  $\mu\text{g/mL}$ , Pefabloc 1mg/mL y PMSF 200  $\mu\text{g/mL}$ . El homogenado se centrifugó a 14.000 xg durante 10 minutos a 4°C, recogién dose el sobrenadante. Después de determinar la concentración de proteínas, dos volúmenes de extracto celular se mezclaron con un volumen de una solución 3 veces concentrada del tampón de muestras de electroforesis (concentraciones finales: 10% (v/v) glicerol; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol; 2% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS); 0,0005% azul de bromofenol; 62,5 mM Tris-HCl). Con objeto de desnaturalizar las proteínas, las muestras se sometieron a 100°C durante 10 minutos en un calentador en multibloque.

El extracto celular se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (Laemmli, 1970). Las muestras proteicas se aplicaron en pocillos de geles de 10% (p/v) de acrilamida en el sistema de electroforesis Hoefer miniVe (Amersham) y la electroforesis se desarrolló a 4°C en tampón 0,1% SDS, 200 mM glicina; 25 mM Tris; pH 8,3, durante 55 minutos a un voltaje constante de 200 V. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones proteicos coloreados de peso molecular conocido.

Tras el proceso electroforético, los geles se equilibraron durante 10 minutos en tampón de transferencia (192 mM glicina; 20% (v/v) metanol; 25 mM Tris; pH 8,3) y se transfirieron a una membrana de PVDF (previamente humedecida en metanol y equilibrada en el mismo tampón) durante 2 horas (4°C) a una intensidad de 300 mA. Finalizada la transferencia, se incubó con PBS 0,01% Tween 20 con 3% leche deslipidizada durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se realizó la incubación con el anticuerpo primario (anti-sGC 1:1.000) durante toda la noche a 4°C con agitación orbital continua. Tras la eliminación del exceso de anticuerpo lavando con PBS +0,05% Tween 20, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario ligado a peroxidasa (anti-IgG HRP de conejo, 1:10.000) a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de anticuerpo secundario se lavó con tampón PBS + Tween-20 y la membrana se reveló con el sustrato luminiscente (Pierce) siguiendo las instrucciones del suministrador.

Para verificar que las dos bandas que aparecían correspondían a las dos subunidades de la guanilato ciclasa soluble, se utilizaron los péptidos derivados bien de la subunidad  $\alpha_1$  o de la  $\beta_1$  que habían sido usados como antígenos para la producción del anticuerpo de la casa Cayman. Tres blots con extractos celulares se revelaron en paralelo bien con el anticuerpo anti-sGC sólo, o bien con éste mismo previamente bloqueado con el péptido  $\alpha$  (10  $\mu$ g de anti-sGC + 200 ng de péptido  $\alpha$ ) o con el  $\beta$  (10  $\mu$ g de anti-sGC + 240 ng de péptido  $\beta$ ) durante 10 min. La detección se realizó normalmente con las concentraciones de anticuerpo secundario y los medios ya descritos.

La captura de las imágenes de quimioluminiscencia, así como el análisis de las mismas se realizó con el sistema Flúor-S de Bio Rad.

Con el objeto de asegurar que se había cargado la misma cantidad de proteína en todas las calles, se procedió a la eliminación del anticuerpo anti-sGC de la membrana y posterior detección de actina, considerada una proteína constitutiva cuya expresión se mantiene constante (independientemente de los tratamientos a los que se sometan las células). Para ello se trató la membrana con una solución 100 mM 2- $\beta$  mercaptoetanol, 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl; pH=6,7 durante 30 minutos a 50 °C con agitación ocasional. Este tratamiento consigue romper la unión antígeno-anticuerpo, de forma que se puede realizar la detección de otra proteína en la misma membrana. Después de este tratamiento, la membrana se bloqueó con PBS-0,05% Tween y 5% leche y se realizó la incubación con el anticuerpo primario anti- $\alpha$  actina en el medio de bloqueo a una concentración 1:1.000 durante toda la noche a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de anticuerpo por lavados con PBS y se incubó con anti-IgG-HRP 1:5.000. El revelado y cuantificación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

### **Inmunoprecipitación de guanilato ciclasa soluble**

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron células sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/pocillo. El suero se retiró 24 horas antes del



experimento y las células se sometieron a diferentes tratamientos. Las células se lavaron y se adicionaron 300  $\mu$ L del tampón de lisis de composición 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% Nonidet-P40, 50 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 200  $\mu$ g/mL PMSF, 10  $\mu$ g/mL leupeptina, 10  $\mu$ g/mL pepstatina; pH=7,5. El extracto se centrifugó en Microfuga a 14.000 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y con objeto de disminuir la unión inespecífica al anticuerpo secundario utilizado para la inmunoprecipitación, estos sobrenadantes se incubaron durante 1 hora a 4°C con dicho anticuerpo (anti-IgG de conejo generado en cabra y ligado a agarosa) a una dilución de 1:18. Posteriormente estos extractos se centrifugaron en Microfuga a 200 xg durante 1 min para precipitar el anticuerpo ligado a agarosa y el sobrenadante se recogió para la incubación con el anticuerpo primario.

De estos sobrenadantes se tomó un volumen de cada muestra, que contenía la misma cantidad de proteínas en todos los casos, y dichas fracciones se llevaron a un volumen final de 1 mL con tampón de lisis 2% BSA en ausencia de detergente, al que se añadió el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal frente a guanilato ciclasa soluble generado en conejo) a una dilución de 1:100. Esta incubación se realizó a 4°C durante aproximadamente 15 horas.

Paralelamente a esta incubación el anticuerpo secundario se equilibró en tampón de lisis que contenía 10% BSA (p/v) en una dilución 1:5. Se centrifugó a 200 xg 1 min retirándose el sobrenadante y resuspendiéndose en un volumen pequeño de tampón de lisis. A continuación se añadió el anticuerpo secundario a las muestras incubadas con el anti-sGC, a una dilución final de 1:18 y se incubó durante 1 hora a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de agarosa se lavó 5 veces con 1 ml de tampón de lisis pero sin inhibidores ni albúmina. Finalmente el sedimento se solubilizó en 30  $\mu$ L de tampón 10% (v/v) glicerol; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol; 3% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS); 0,005% (p/v) azul de bromofenol; 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8. Con objeto de desnaturalizar las proteínas los tubos se sometieron a 95°C durante 5 minutos en un calentador en multibloque y después se centrifugaron en Microfuga para eliminar las moléculas de agarosa.

### **Determinación del estado de fosforilación de la guanilato ciclasa soluble**

Los sobrenadantes obtenidos por inmunoprecipitación de la enzima, descrito en el apartado anterior, fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (Laemmli, 1970). Las muestras se aplicaron en pocillos de geles de 7,5 % (p/v) de acrilamida y la electroforesis se desarrolló a 4°C, manteniendo un voltaje constante de 200 V. Uno de los pocillos del gel se reservó para una mezcla de patrones proteicos coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se detuvo cuando la banda azul de bromofenol llegó al final del gel. A continuación se procedió a transferirlo a una membrana de PVDF, como ya se ha descrito.

El bloqueo de las membranas se realizó en tampón TBS (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 10 mM NaF; 0,05% Tween 20; pH=7,4) con 2% BSA. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo en este mismo medio. Este medio se eligió por no presentar grupos fosfato que pudieran competir en la unión de los anticuerpos anti-fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina con nuestra proteína. La presencia de NaF, inhibidor de fosfatasas nos asegura que el estado de fosforilación de la guanilato ciclase soluble no se ve modificado durante el proceso de inmunodetección.

La fosforilación de los extractos se determinó mediante detección de residuos fosforilados con anticuerpos específicos:

-para secuencias fosforiladas en residuos de serina (anti-pSer). La dilución del anticuerpo primario fue 1:10.000. Los lavados se realizaron con medio TBS y la incubación con el anticuerpo secundario, anti-IgM-HRP de ratón, se hicieron a una dilución 1:20.000 en medio de bloqueo.

-para secuencias fosforiladas en residuos de treonina (anti-pThr). La dilución del anticuerpo primario fue 1:10.000. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG-HRP de ratón a una dilución 1:20.000.

-para secuencias fosforiladas en residuos de tirosina (anti-pTyr-HRP). El bloqueo y lavados fueron como se ha descrito. La dilución del anticuerpo primario utilizada fue 1:1.000. No fue necesaria la incubación con anticuerpo secundario ya que el anticuerpo primario está unido a HRP.

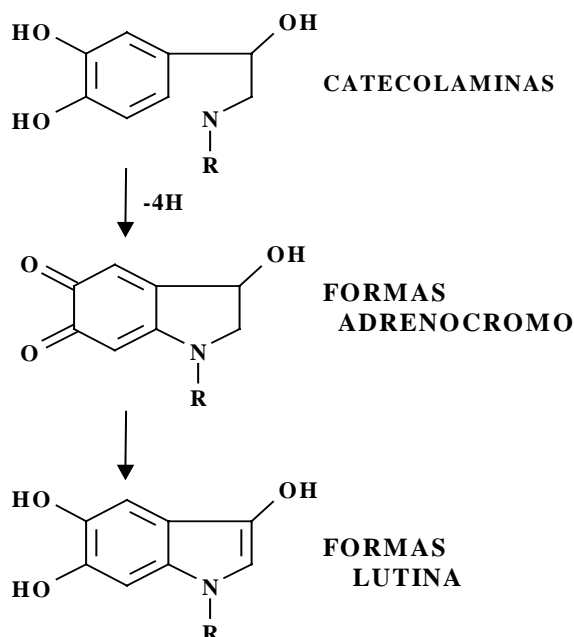
En todos los casos el revelado se realizó con Super Signal Substrate de Pierce, como se ha descrito previamente.

### **Determinación de catecolaminas de células cromafines**

Para este tipo de experimentos, las células se sembraron en multiplacas de 24 pocillos a una densidad de 0,5 ó  $1 \times 10^6$  cel/pocillo/ml de medio de cultivo.

Adrenalina y noradrenalina son moléculas con propiedades de óxido-reducción que pueden detectarse gracias a este comportamiento químico. Para la determinación de catecolaminas totales (A+NA), se utilizó la detección fluorimétrica. La técnica usada en este trabajo de investigación explota estas características redox.

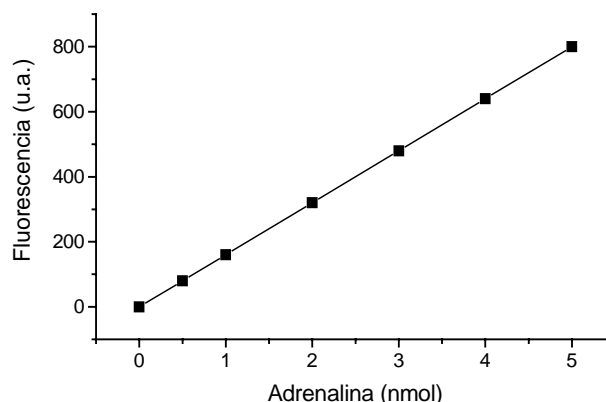
Este método se basa en la oxidación de las catecolaminas a sus derivados fluorescentes trihidroxi indólicos (lutinas) (Elworthy, 1986). Esta oxidación tiene lugar en presencia de oxidantes como ferricianuro y las catecolaminas llevan rápidamente a cabo una ciclación dando lugar a las formas adrenocromo. Estas formas adrenocromo o noradrenocromo se isomerizan tras el tratamiento con una base fuerte y forman 1-metil-3,5,6-trihidroxi indol (adrenolutina) ó 3,5,6-trihidroxi indol (noradrenolutina), respectivamente.



**Figura II.3. Esquema de la reacción de formación de los derivados trihidroxi indol.** (R=H, noradrenalina; R=CH<sub>3</sub>, adrenalina).

Las lutinas fluorescentes son compuestos muy inestables que rápidamente podrían oxidarse dando lugar a derivados no fluorescentes. La adición de ácido ascórbico junto con la base fuerte estabiliza la fluorescencia, alargando la vida de las lutinas fluorescentes.

Para este experimento, las células se lavaron 2 veces con solución de Locke y se preincubaron durante 30 min en esa misma solución. Dependiendo del experimento particular las células fueron preincubadas con determinados agentes previo al período de estimulación. La estimulación se realizó en un volumen final de 200 µl de solución de Locke conteniendo el compuesto a estudiar su efecto sobre la secreción. Tras el período de estimulación, el medio extracelular conteniendo las catecolaminas liberadas se transfirió a tubos Eppendorf preenfriados a 4°C y sobre las células se añadieron 300 µl de 10 % (v/v) ácido acético. Las células se rasparon en esa solución y se centrifugaron en Microfuga obteniéndose un sobrenadante que contenía las catecolaminas no liberadas por las células. Las medidas se realizaron en cubetas para fluorescencia que contenían 100 µl de medio extracelular ó 10 µl del sobrenadante procedente de las catecolaminas no liberadas (en este caso se igualó a un volumen de 100 µl con solución de Locke). A las cubetas se añadieron 500 µl de tampón fosfato (6 µM CuSO<sub>4</sub>, 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,0). La oxidación se disparó añadiendo 50 µl de oxidante 2 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y la reacción se detuvo a los 5 minutos exactos con 500 µl de una solución conteniendo 1 N KOH y 8 mg/ml ascorbato. Las cubetas se dejaron reposar al menos 5 min y se midió la fluorescencia de las mismas excitando a una longitud de onda de 410 nm, registrándose la emisión a 520 nm.



**Figura II.4.** Ejemplo de recta de calibrado para la determinación de catecolaminas mediante el método fluorimétrico

Para conocer la cantidad de catecolaminas presentes tanto en el medio extracelular como la que permaneció en el interior de las células tras el período de estimulación, las medidas obtenidas se compararon con valores obtenidos para una serie de cubetas con cantidades crecientes de adrenalina patrón a las que se sometió a idéntico protocolo que a las muestras celulares. Para este fin se construyó una recta de calibrado de rango 0,5-5 nmol de adrenalina. Como puede verse en el ejemplo de recta patrón, dentro de ese rango se cumplió una perfecta linealidad y las catecolaminas en las muestras se determinaron por interpolación en dicha recta.

## EXPERIMENTOS DE PCR SIMPLE Y CUANTITATIVA

### Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total de células cromafines, se utilizaron células sembradas a una densidad de  $5 \cdot 10^6$  células por pocillo. El procedimiento de extracción del ARN se realizó con un kit cuyo fundamento está basado en la capacidad de unión del ARN a una membrana de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales (RNAeasy Midi kit, Quiagen). Se emplearon raspadores celulares estériles para levantar las células de las placas y se utilizaron 600  $\mu$ l de tampón desnaturante (conteniendo isotiocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol, 10  $\mu$ l/ml) para resuspender las células. Las muestras, una vez disgregadas, se pasaron varias veces a través de agujas estériles de tamaño 20-G (0,9mm  $\varnothing$ ) para completar la homogenización y disminuir la viscosidad del lisado. A continuación, se añadió un volumen igual de etanol, para conseguir las condiciones óptimas de unión, y las muestras se centrifugaron a  $\geq 8.000$  xg en columnas que contenían la membrana de sílicagel a la que se unen por adsorción moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos. Por tanto los ARN 5.8S, 5S y de transferencia quedaron en el eluido. Después de cada extracción y de forma rutinaria, las muestras

de ARN se trataron con ADNasa I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) durante 1 hora a 37°C, tras lo cual se limpiaron y se resuspendió el ARN en un volumen final de 30-50 µl de agua estéril libre de ARNasas.

### Cuantificación de ARN

En los ensayos de RT seguida de PCR-cuantitativa, la cantidad de ARN fue un factor crítico y fundamental para mantener el rigor en la estimación de las cantidades relativas en cada tubo de reacción. Por tanto, las muestras de ARN que se destinaron a este tipo de experimentos se cuantificaron empleando un método fluorimétrico de gran sensibilidad, que emplea el reactivo de Molecular Probes RiboGreen<sup>TM</sup> RNA Quantitation Reagent. El RiboGreen unido a ARN tiene el máximo de excitación a 500 nm y el de emisión a 525 nm y permite una cuantificación de hasta 1ng/ml de ARN.

### RT-PCR simple

Las reacciones de RT-PCR simple se llevaron a cabo en un solo paso empleando el kit Access RT-PCR System de Promega. La utilización de las dos enzimas en un solo tubo de reacción se hizo posible gracias a las diferentes temperaturas a las que cada una de ellas desarrolla su actividad enzimática. La transcriptasa inversa AMV tiene una actividad óptima a 48°C y se inactiva a 94°C, temperatura de desnaturalización a la que comienzan los ciclos de PCR y aparece la actividad enzimática de la polimerasa Tfl1.

En un volumen final de 25 µl por tubo o reacción, se añadieron, en un tampón común, 0,05u de cada enzima, transcriptasa inversa AMV y polimerasa Tfl1, 1,5 mM Mg<sup>2+</sup>, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0,2 mM cada uno), la pareja de oligonucleótidos específicos para cada subunidad α y β (300 nM) y 0,5-1 µg de ARN limpio y purificado. La reacción se desarrolló siguiendo el siguiente esquema:

45 min, 48 °C	2 min, 94 °C	40 ciclos	7 min, 68 °C
Transcripción <i>in vitro</i>	Desnaturalización e inactivación de AMV	40s, 94 °C desnaturalización 30s, 60 °C anillamiento 1min 30s, 68 °C elongación	Elongación

Cada reacción de RT-PCR se realizó en paralelo con un control sin ARN y para cada nueva muestra de ARN se realizó un control en el que no se añadió la transcriptasa inversa AMV. De este modo en todo momento se tuvo la seguridad de que los fragmentos amplificados en cada reacción correspondían a secuencias del ARNm presente en las células.

Los oligonucleótidos específicos empleados para amplificar las subunidades α y β fueron diseñados utilizando el programa de Applied Biosystems, Primer Express.

Subunidad	Fordward	Reverse	pb
□ <sub>1</sub>	TTTGCAAACCTGATTTT CCCA	TATCCAGGCATAGGA TGGATG	351
□ <sub>1</sub>	ACGTTACGAGCCCTG GAAG	CTACCTCCCCTGTGTG GATC	451

#### *RT y PCR-cuantitativa: método de SYBR-green*

El método que se empleó para la cuantificación de la expresión de las dos subunidades de GCs de células cromafines, se basa en la detección directa de la aparición de un producto de PCR mediante la medida de la fluorescencia emitida por el complejo formado por SYBR green y la doble cadena de ADN en formación.

Dicho método permite una cuantificación relativa de la expresión de los genes en estudio gracias a la normalización respecto a un gen de referencia, que suele ser de los denominados “house keeping”, cuya expresión no debe variar a lo largo del tiempo, entre distintos tipos celulares o como consecuencia de tratamientos farmacológicos, y por tanto su amplificación por PCR permanecerá constante y proporcional en cada experimento que se realice. En nuestro caso, el gen de referencia elegido fue el del ARN ribosómico 18S ya que la expresión de los habitualmente empleados, como el de la  $\beta$ -actina o la GADPH, no es tan constante como se pensaba.

Puesto que la cuantificación final se basa en una normalización respecto al gen de referencia, interesa que se amplifique en el mismo rango en que lo hacen los genes que se estudian. Para conseguir ese rango de amplificación similar se utilizó la técnica de “competimers”, primers cuyo extremo 3'OH está modificado, de manera que no permiten la amplificación una vez pegados a sus secuencias complementarias en el ADNc (Competimer™ Technology, Ambion). En una reacción de PCR previa se comprobó cual era la relación primer/competimer óptima (1:9, 2:8 ó 3:7) que permitía una amplificación del gen de referencia dentro del rango de la que se producía con los oligonucleótidos de las subunidades de GCs. La relación óptima resultó ser 3:7 que se corresponde con la cantidad recomendada para el estudio de genes con un nivel moderado de expresión.

El molde para la reacción de PCR es el ADNc sintetizado en una reacción previa de transcripción inversa, en la que se pueden emplear como cebadores oligo-dT o hexanucleótidos. La elección de unos u otros está sujeta a los requerimientos experimentales y, en nuestro caso, teniendo como referencia un ARN ribosómico, obligaron al empleo de los segundos frente a los primeros.

De modo que para la reacción de RT se añadieron, en un tampón común, 1,25U/ $\mu$ l de transcriptasa inversa MultiScribe, 0,5U/ $\mu$ l de Inhibidor de ARNasa, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>,

la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0,5 mM cada uno), hexanucleótidos (2,5  $\mu$ M) y 1  $\mu$ g de ARN limpio y purificado, para un volumen final de 25  $\mu$ l por tubo. La reacción tuvo lugar según se refleja en la siguiente tabla:

10 min, 25 °C	45 min, 48°C	5 min, 95°C
Incubación	Transcripción inversa	Inactivación de la enzima

Los ADNcs que fueron analizados en un mismo experimento, se obtuvieron en el mismo día a partir de reacciones de RT paralelas para, de ese modo, evitar introducir errores debidos a la posible variación “día a día/interdía” en la eficiencia de la reacción. Además, siempre que el número de tubos lo permitió, se realizaron premezclas de todos los componentes, a excepción del ADNc con el que se disparan la reacciones, para minimizar los posibles errores de pipeteo.

Para cada reacción se añadieron 2,5  $\mu$ l de tampón 10x, 1,5 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2  $\mu$ l de dNTPs (concentración final: 200  $\mu$ MdATP, 200  $\mu$ M dCTP, 200  $\mu$ M dGTP y 400  $\mu$ M dUTP), 0,25  $\mu$ l de AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ l), la cantidad adecuada de primers específicos y agua hasta un volumen final de 25  $\mu$ l. La reacción de PCR se programó según el siguiente esquema:

10 min, 95 °C	40 ciclos	7 min, 68 °C
Activación del enzima AmpliTaq Gold	40s, 94 °C desnaturalización 30s, 60 °C anillamiento 45s, 68 °C elongación	Elongación

### Análisis de datos

Los resultados presentados en este trabajo de investigación corresponden a un mínimo de tres experimentos realizados en duplicado o triplicado y obtenidos a partir de, al menos, dos preparaciones distintas de células. Los valores indicados en el texto o presentados en los gráficos representan el valor medio  $\pm$  la desviación estándar de la muestra de valores experimentales.

Las curvas concentración-respuesta para obtener valores de EC<sub>50</sub> ó IC<sub>50</sub> se ajustaron a un modelo sigmoideal de la forma logaritmo de la concentración frente a la respuesta. Tanto para estos ajustes como para la propia realización de los gráficos presentados en este trabajo se utilizaron los programas *Figure Processor* que emplea el ajustador de ecuaciones *Parameter Fitter* (Biosoft), y Origin 6.0 para Windows.

Las comparaciones entre pares de valores medios se realizaron por medio de una prueba *t* de Student. Las significaciones estadísticas indicadas en las figuras corresponden a los valores: \*\*\* (diferencia extremadamente significativa)  $p < 0,001$ ; \*\* (diferencia muy significativa)  $p < 0,01$ ; \* (diferencia significativa)  $p < 0,05$ ; n.s.  $p > 0,05$ .





El grupo en el que se ha desarrollado el presente trabajo había caracterizado con anterioridad la vía de señalización basada en el NO/GMPc en las células cromafines bovinas, así como su papel en la regulación del proceso neurosecretor. Debido al enorme interés suscitado por los procesos en los que estaba implicado el NO, a los diferentes mecanismos por los que este compuesto puede ejercer su acción y al gran número de compuestos empleados como fuente de NO exógeno, en la literatura existen numerosas controversias. Algunas de ellas surgen por el uso de diferentes donadores y distintas concentraciones de NO. Actualmente se sabe que existen distintos mecanismos implicados en las acciones del NO, dependiendo de la concentración a la que este compuesto se produzca. A bajas concentraciones de NO el principal sistema efector es la guanilato ciclasa soluble. Por tanto los objetivos planteados en este trabajo fueron:

- La caracterización de diferentes donadores de NO, en cuanto a su capacidad para producir NO en medios fisiológicos y su potencia para activar a la guanilato ciclasa soluble.
- Estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la actividad guanilato ciclasa soluble, prestando especial atención a la posible implicación de la vía de señalización del GMPc.
- Estudiar el efecto de tratamientos prolongados con bajas concentraciones de NO sobre la actividad guanilato ciclasa soluble como posible causa del fenómeno de tolerancia a nitrovasodilatadores.
- Analizar los mecanismos implicados en la desensibilización de la guanilato ciclasa soluble tras estimulación prolongada con NO.
- Estudiar el efecto del tratamiento prolongado con un activador de la guanilato ciclasa soluble (YC-1) independiente de la producción de NO.



## **1. LAS CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**

Durante años, las células cromafines se han utilizado como modelo de secreción en estudios sobre mecanismos endocrinos, funcionamiento neuronal y de la biología de los procesos secretorios. Las células cromafines derivan, durante el proceso de embriogénesis, de los mismos precursores que las neuronas simpáticas, por lo que presentan algunas propiedades en común con las neuronas, tal como la presencia de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$  dependientes de voltaje y una variedad de proteínas “específicas de neuronas” (Burgoyne, 1991).

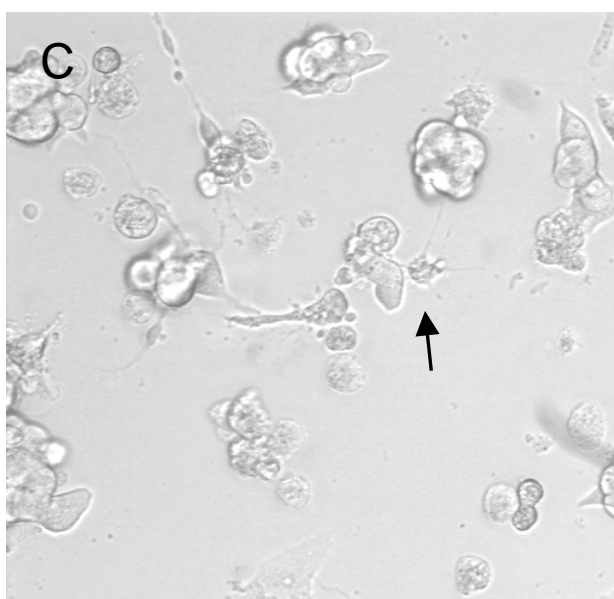
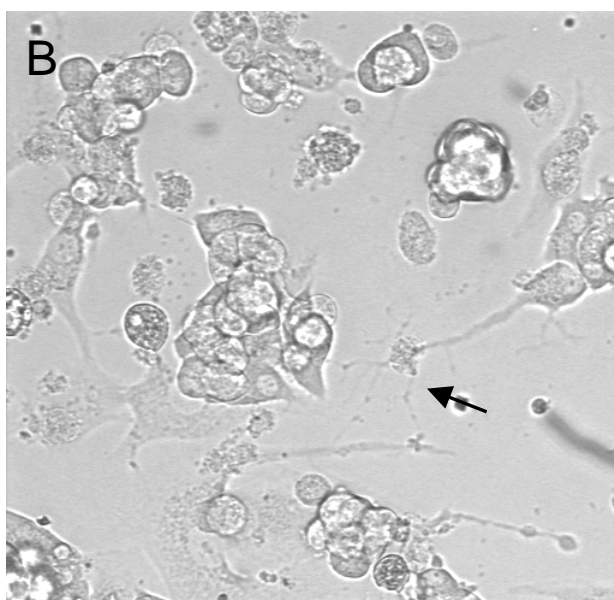
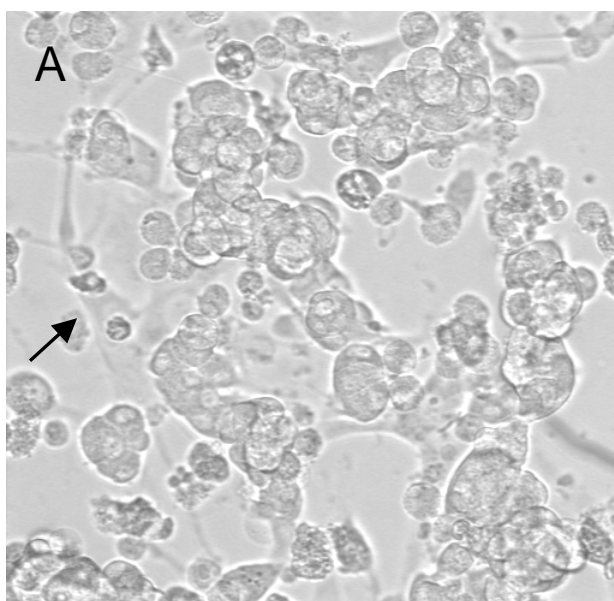
La médula adrenal bovina está formada por un parénquima endocrino de donde se aíslan las células cromafines. Está constituida en aproximadamente un 50% por células no cromafines, entre las que se cuentan células ganglionares, fibras nerviosas, fibroblastos y células endoteliales, siendo estas últimas el tipo celular no cromafín mayoritario (Kobayashi & Coupland, 1993). Esto determina que sea necesario un proceso de obtención y purificación que permita el aislamiento de poblaciones de alta pureza en cromafines, sin redundar en un menor rendimiento.

Como se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos, las características de digestión de la médula permiten que, ajustando el tiempo de tratamiento, la corteza permanezca intacta y no se produzcan contaminaciones con células corticales en nuestros cultivos. Los dos métodos descritos, originan un rendimiento de aproximadamente un 5% respecto al total de 500 millones de células cromafines que se estima en las glándulas adrenales (Phillips et al., 1982). A pesar de éste bajo rendimiento, el número de células que se suelen obtener, se puede considerar razonable y suficiente para el tipo de ensayos que se aplican.

La figura muestra la fotografía de un cultivo de células cromafines 72 horas después de su aislamiento y sembrado. Al observarlas en contraste de fase, estas células se distinguen de manera prácticamente inequívoca gracias a ciertas características como la forma redondeada, un halo brillante, y su tendencia a agregarse entre sí. Muchos autores han descrito que, con el tiempo en cultivo, estas células tienden a emitir prolongaciones en forma de neuritas (Uinsicker et al., 1980). En las fotografías presentadas se pueden distinguir principios de dichas prolongaciones.

Estudios morfológicos clásicos indican que las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, se almacenan en distintas células en la glándula adrenal, diferenciando por tanto entre células adrenérgicas y noradrenérgicas (Hillarp & Hökfelt, 1955; Eranko et al., 1955). La diferencia principal entre ambos subtipos celulares, radica en la presencia o ausencia de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), que transforma la noradrenalina a adrenalina por metilación. Estudios de inmunofluorescencia, distinguiendo células cromafines por marcaje con anticuerpos contra la enzima tirosina hidroxilasa, y entre ellas el subtipo adrenérgico por marcaje específico con anticuerpos contra PNMT, han permitido determinar que la población adrenérgica constituye, normalmente, un 80-85% de las células cromafines aisladas en cultivo.

En estudios previos realizados por nuestro grupo, se demostró que las células cromafines bovinas presentan los elementos de la ruta NO-GMPc, esto es, NOS I, GCs y PKG 1 $\alpha$  (Rodríguez-Pascual et al., 1995a). Este hecho hace que éste tipo celular sea útil en el estudio de los procesos mediados por la elevación de los niveles de GMPc, inducidos por la activación de GCs. Estos estudios se basaron en la medida de los niveles de GMPc, considerando ésta medida como una cuantificación indirecta de la cantidad de NO que activa a la GCs. Los efectos del NO son dependientes del tiempo y la dosis introducida.



**Figura IV.1. Fotografía de células cromafines bovinas en cultivo.** Las fotografías muestran tres cultivos de células cromafines. En el panel A se marca una célula endotelial contaminante, que se observa en un plano inferior. En los paneles B y C se marcan células cromafines con prolongaciones en forma de neuritas.

## **2. MOLÉCULAS DONADORAS DE ÓXIDO NÍTRICO**

En la actualidad se dispone de varios tipos de agentes liberadores de NO: diazeniodiolatos, más conocidos como NONOatos, S-nitrosotioles, nitrosocomplejos, nitratos y nitritos orgánicos, sidnoniminos y aductos nucleófilo-NO. Estos compuestos presentan efectos biológicos muy diversos, incluso a veces opuestos entre sí (Chen & Schofield, 1993; Desole et al., 1994). Estas diferencias podrían explicarse por las concentraciones empleadas de los diferentes compuestos, así como los distintos tiempos de incubación y otras variaciones en las condiciones experimentales.

Para nuestro estudio se seleccionaron cuatro donadores de NO: nitroprusiato sódico, SNAP, DEA/NO y SPER/NO. El primero, pertenece al grupo de los nitritos orgánicos, y ha sido ampliamente utilizado en los estudios relacionados con el NO; se caracteriza porque, en ausencia de células, no es capaz de liberar el óxido nítrico. El SNAP es uno de los S-nitrosotioles más utilizados. Este compuesto libera espontáneamente NO y comparte con el SNP su sensibilidad a la luz. Los dos últimos compuestos, el DEA/NO y SPER/NO son NONOatos, caracterizados por su descomposición espontánea y consecuente liberación de NO en condiciones de pH fisiológico.

Aunque existen algunos estudios sobre estos compuestos abordando las diferencias entre los efectos obtenidos según del donador que se introduzca, y estudiando parámetros de liberación y vidas medias de algunos de ellos, se ha comprobado que los distintos tipos celulares utilizados, así como las condiciones experimentales específicas, impiden que estos resultados puedan, en su conjunto, ser considerados como una pauta válida para comparar y elegir un donador frente a otros (Ionnadis et al., 1996; Keefer et al., 1996). Por eso, el primer paso de este trabajo se centra en la caracterización de varios compuestos donadores de NO, de origen químico muy diverso, siempre teniendo en cuenta las condiciones experimentales particulares de nuestro modelo celular, para poder seleccionar el más adecuado a cada estudio en particular.

### **2.1. LIBERACIÓN DE NO A PARTIR DE DISTINTOS DONADORES DE NO**

Para determinar la cantidad de NO en el medio de incubación, utilizamos los dos métodos ya descritos: la reacción de NO con hemoglobina reducida (Miles et al., 1996; Privat et al., 1997; Murphy & Noack, 1994), y la determinación de nitritos (Misko et al., 1993). Las determinaciones de NO y nitritos descritas en este apartado, se llevaron a cabo tanto en ausencia como en presencia de células. En ausencia de células no se pudieron obtener datos de liberación de NO a partir de SNP, ya que se ha descrito que este donador precisa de algún mecanismo celular para liberar este compuesto (Bates et al., 1991).

### 2.1.a. Determinaciones en ausencia de células

#### 2.1.a.1. Determinación de la estequiometría de los donadores de NO

La cuantificación de los nitritos originados en el medio acuoso por reacción del NO con el oxígeno, representa un fiel reflejo de la cantidad de NO que se ha liberado al medio, ya que la generación de  $\text{NO}_2^-$  se produce de forma equimolecular respecto de las moléculas de NO liberadas, y que a su vez los nitritos reaccionan 1 a 1 con el compuesto utilizado para su determinación, el DAN, convirtiéndolo en NAT. Así, conociendo la concentración de partida del donador y la cantidad de nitritos que se detectan, obtenemos una relación de las moléculas de NO que se liberan por cada molécula de compuesto inicial (tabla 1). Puesto que esta reacción se lleva a cabo en medio ácido y los NONOatos se descomponen a este pH, la medida de nitritos nos sirvió para determinar la estequiometría de la reacción de descomposición de DEA/NO y SPER/NO.

Dado que no pudimos garantizar la descomposición de SNAP en ningún medio específico, no fué posible establecer la estequiometría para este compuesto. En el caso de SNAP, los valores que se reflejan en la tabla son las concentraciones de nitritos y NO alcanzadas tras 15 min de incubación.

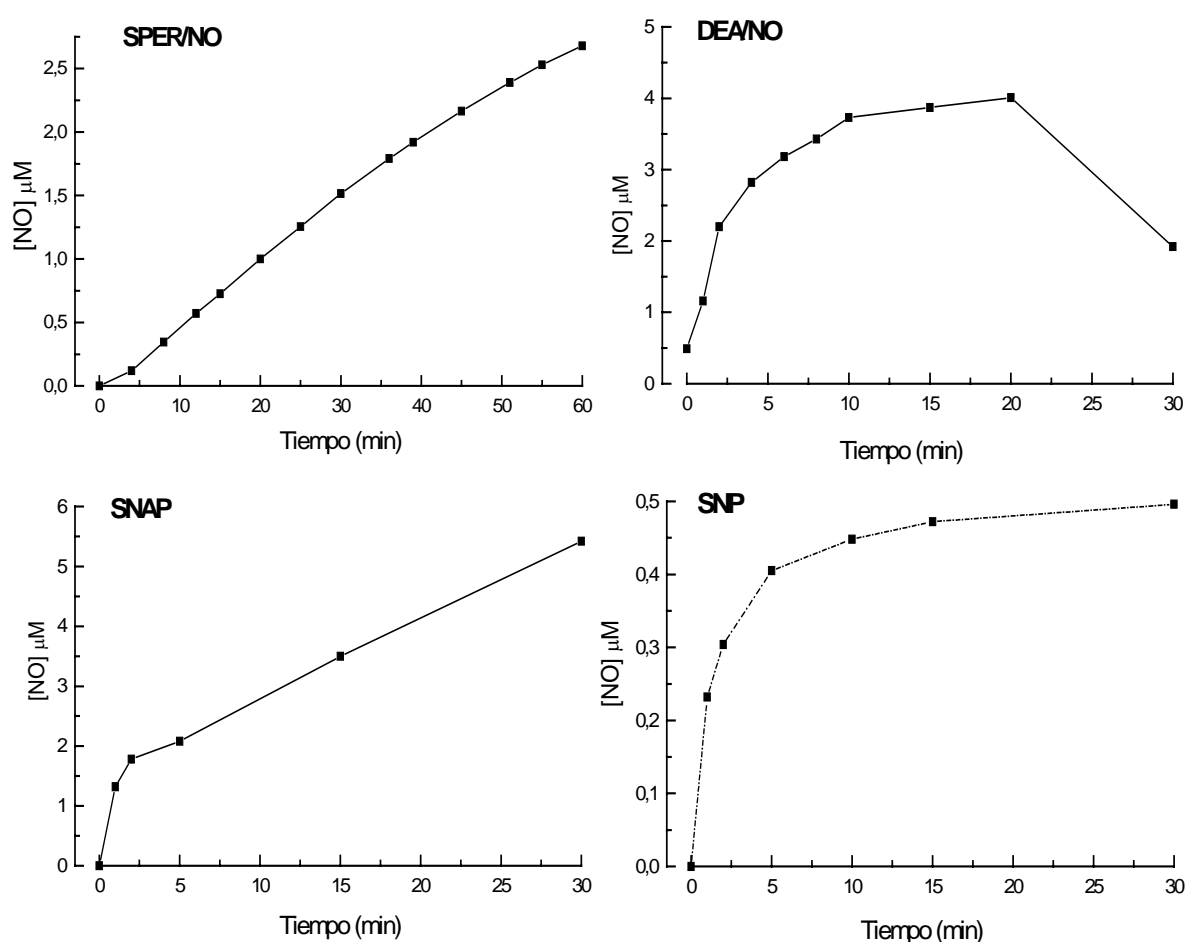
Tabla IV.1. PRODUCCION DE NO Y NITRITOS POR DONADORES DE NO

	Donador- NO ( $\mu\text{M}$ )	Nitritos ( $\mu\text{M}$ )	NO ( $\mu\text{M}$ )	<u>Etequiometría</u>
<b>SNAP</b>	10	$0.22 \pm 0.03$	$0.19 \pm 0.03$	N.D.
	25	$0.44 \pm 0.20$	$0.47 \pm 0.09$	N.D.
	50	$1.08 \pm 0.03$	$0.78 \pm 0.07$	N.D.
	100	$2.06 \pm 0.05$	$2.28 \pm 0.11$	N.D.
<b>DEA/NO</b>	1	$1.15 \pm 0.20$	—	1.15
	2.5	$3.03 \pm 0.34$	—	1.20
	5	$6.27 \pm 0.81$	—	1.25
<b>SPER/NO</b>	1	$1.40 \pm 0.30$	—	1.4
	2.5	$4.30 \pm 0.07$	—	1.72
	5	$9.67 \pm 0.38$	—	1.94
	7.5	$14.37 \pm 0.50$	—	1.92



### 2.1.a.2. Liberación de NO al medio de incubación a lo largo del tiempo

Se realizó una cuantificación del NO que se había liberado a partir de una concentración de donador, a lo largo de periodos de tiempo de hasta 60 min. El ensayo se realizó mediante la oxidación de hemoglobina, producto que al reaccionar con NO se fué acumulando en el medio en ausencia de células. La determinación de la cantidad de hemoglobina oxidada presente en fracciones de medio recogidas a distintos tiempos, nos proporciona una idea de la cinética de descomposición de cada compuesto (figura 2). Las concentraciones de donadores estudiadas fueron, de 5  $\mu$ M SPER/NO, 2,5  $\mu$ M DEA/NO, 100  $\mu$ M SNP y SNAP 250  $\mu$ M. La cantidad de NO liberado por SNP, ha sido calculada de acuerdo al modelo propuesto por Brunner et al. (1995).



**Figura IV.2. Medida de NO en función del tiempo.** Los donadores se introdujeron en un medio a pH fisiológico, quedando a las concentraciones especificadas en el texto, en presencia de hemoglobina reducida. Fracciones de medio se fueron retirando y la oxidación ocurrida determinada por espectrofotometría.

La representación semilogarítmica de estos valores, considerando la estequiometría 1,2 para el DEA/NO, 2 para la SPER/NO, según se calculó antes, y 1 para el SNAP

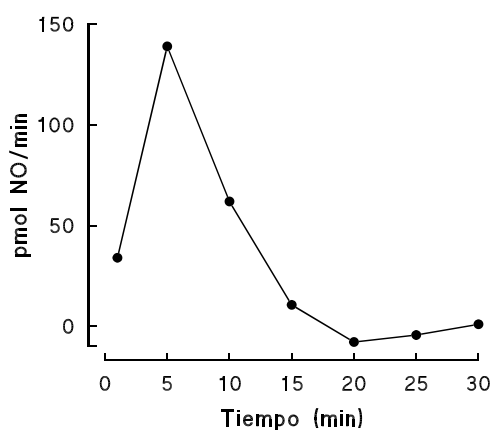
deducida según su estructura química, nos permitieron calcular la vida media para los donadores.

<i>Donador</i>	<i>t<sub>1/2</sub></i>
<b>SNAP</b>	37± 4 hrs.
<b>SPER/NO</b>	37± 3 min.
<b>DEA/NO</b>	3.9± 0.2 min.

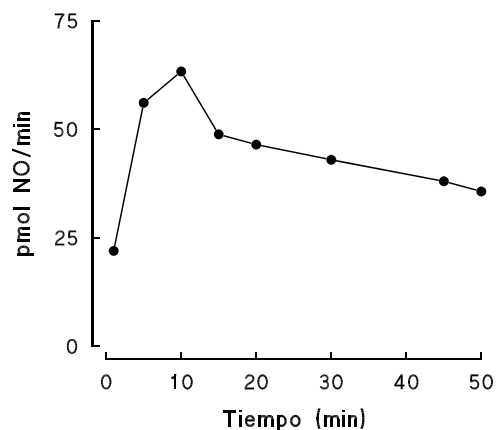
### 2.1.a.3. Velocidades de liberación de NO

Según los datos obtenidos en el apartado anterior, se representó la concentración de NO obtenida por minuto, obteniendo el perfil de velocidad de liberación de NO (fig 3).

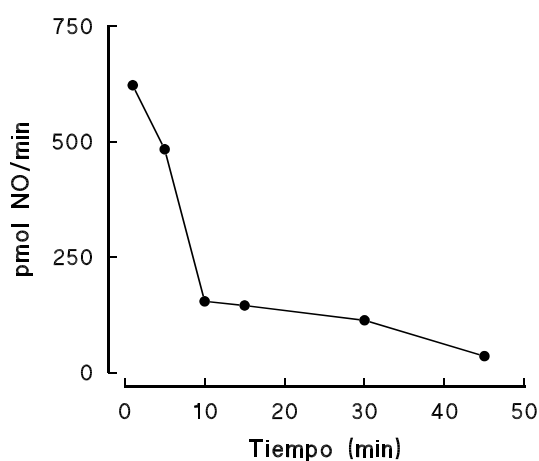
La cantidad de hemoglobina oxidada y aparecida en cada intervalo de tiempo a que se recogió medio para realizar la medida, se calculó teniendo en cuenta la cantidad de donador que ya se había descompuesto en los tiempos anteriores.



DEA/NO 2,5 μM



SP/NO 5 μM

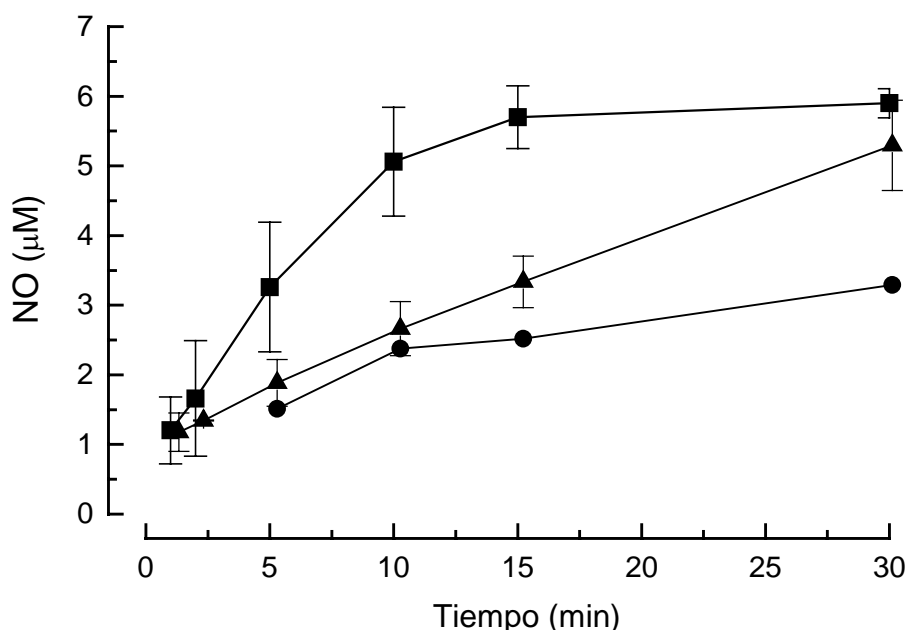


SNAP 250 μM

**Figura IV.3. Velocidad de liberación de NO.** Representación de la cantidad de NO liberado por una concentración de donador a distintos tiempos. Medidas realizadas en ausencia de células por oxidación de hemoglobina.

**n del tiempo**

Se midió la oxidación de hemoglobina en un medio en presencia de células, al que se añadió una concentración de donador. La cantidad de NO liberado se calculó midiendo la absorbancia en fracciones de medio recogido a distintos tiempos. La medida de la oxidación de la hemoglobina, en un medio en presencia de células al que se añade una determinada concentración de donador, nos permite evaluar la cantidad de NO a la que están expuestas las células (figura 4).



**Figura IV.4. Liberación de NO a partir de donadores en función del tiempo en presencia de células.** Medida de la liberación de NO por reacción con hemoglobina reducida a partir de 5 µM DEA/NO (■), 5 µM SPER/NO (●) y SNAP 500 µM (▲) en un medio con células. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos representados son una media  $\pm$  S.E. a partir de tres preparaciones celulares diferentes.

No se pudo realizar este mismo estudio para el SNP, ya que se produjeron reacciones redox, debidas probablemente a la estructura resultante tras la liberación del NO, cuya acumulación en el medio da lugar a errores en la cuantificación.

#### **2.1.b.2. Efecto de los donadores de NO sobre los niveles de GMPc en función del tiempo**

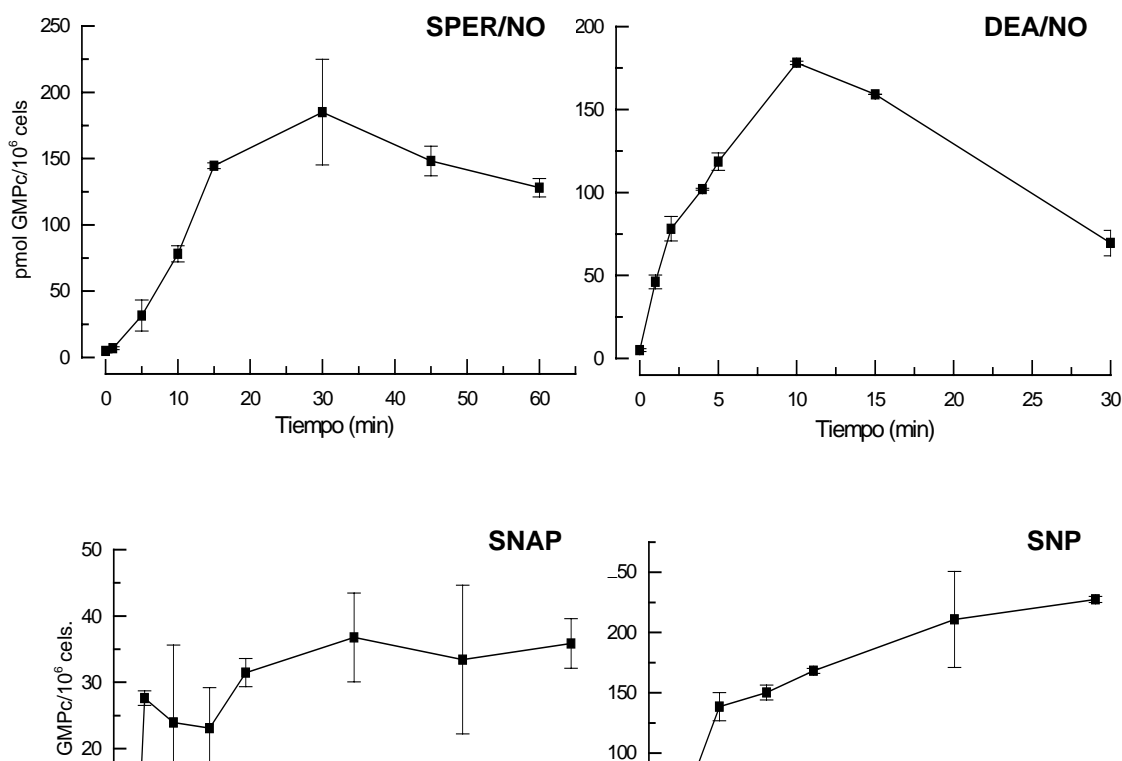
A las células utilizadas para este tipo de medidas, se les retiró el suero del medio, como ya se ha descrito en Materiales y Métodos. Para medir la activación de la GCs al añadir NO exógeno, se realizó una preincubación de las células con un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas, el IBMX, a una concentración 0,5 mM durante 30 min previo a la adición del compuesto activador. Además, el IBMX se mantuvo en el medio durante la estimulación, con el objeto de impedir que el GMPc sintetizado fuera degradado por las fosfodiesterasas. La preincubación con el IBMX causa un

incremento de dos veces en los niveles de GMPc, siendo el contenido basal en células cromafines bovinas de  $1,9 \pm 0,1$  pmol/ $10^6$  células.

Tras la preincubación, se añadió al medio una concentración de donador a partir de una solución madre muy concentrada, de manera que la cantidad de NaOH 0,01 N adicionado en el caso de los NONOatos, no modificó el pH del medio en que se realizó la estimulación. También en el caso del DMSO en el que estaba disuelto el SNAP, la cantidad incorporada al medio para lograr la concentración de donador no fue nunca superior a un 2%; se realizaron controles introduciendo el vehículo que demostraron no tener ningún efecto sobre los niveles de GMPc basales, ni sobre la capacidad de respuesta a NO. En la figura se representan las cantidades de GMPc acumulado a lo largo de la estimulación.

Las concentraciones de donadores utilizadas para obtener una estimulación máxima de la enzima, se determinaron según la cantidad de NO que se había calculado que liberarían. Así, para los NONOatos DEA/NO y SPER/NO, se eligieron concentraciones de 2,5 y 5  $\mu$ M respectivamente. El DEA/NO, según se aprecia en la figura 1, produce una elevación en los niveles de GMPc muy rápida, alcanzando el máximo a los 10 min de incubación; si se mantiene durante tiempos más largos el donador en el medio, los niveles de GMPc que se detectan disminuyen significativamente. En cambio, la SPER/NO produjo un incremento en los niveles de GMPc más lento, tardándose 30 min en alcanzar los valores máximos del nucleótido cíclico; estos niveles son más sostenidos en el tiempo y su caída más lenta.

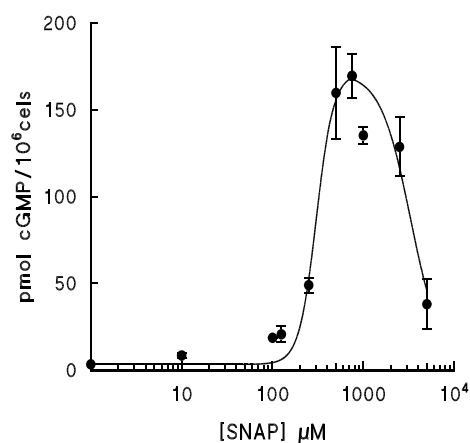
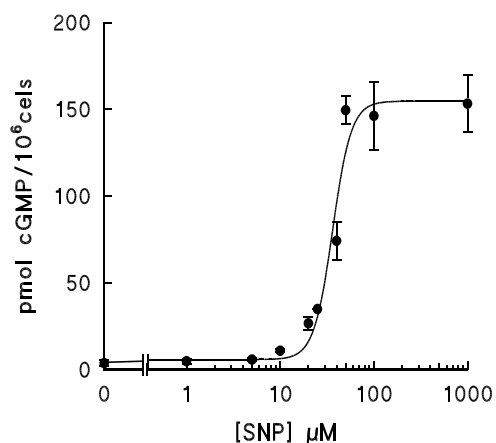
Por otro lado, el nitrosotiol SNAP produjo un incremento de los niveles de GMPc extremadamente rápido y estable en el tiempo, alcanzándose el máximo a los 15 min de incubación. Cuando introdujimos el SNP como sustancia donadora de NO exógeno, obtuvimos también una elevación muy rápida de los niveles de GMPc en los primeros 10 min de incubación. Tanto el SNAP como el SNP, mantuvieron los niveles de GMPc elevados en tanto en cuanto el agente se encontraba presente en el medio, debido a que presentan una  $t_{1/2}$  más larga y liberan NO durante más tiempo.

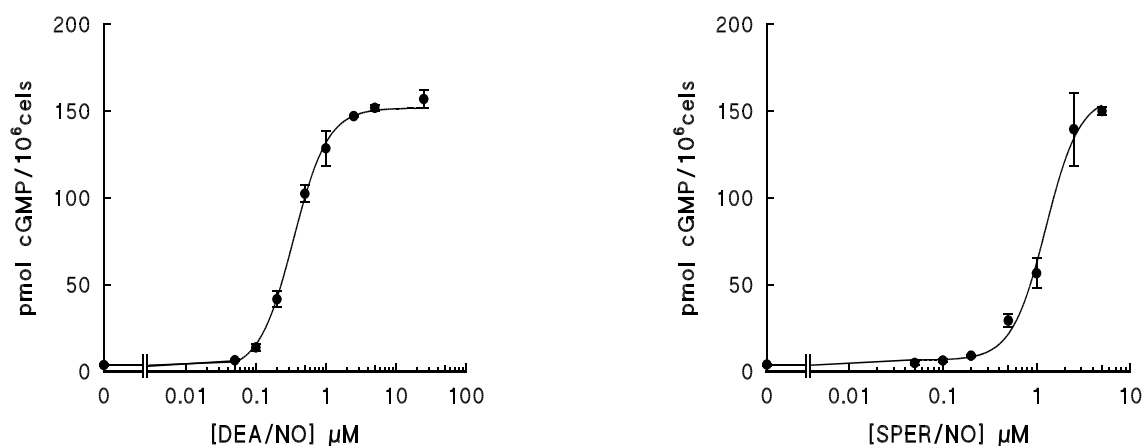


## 2.2. PRODUCCIÓN DE GMPc EN RESPUESTA A DISTINTAS DOSIS DE DONADORES DE NO

En el estudio de la dosis-respuesta a los distintos donadores de NO, se realizó una preincubación con el inhibidor de fosfodiesterasas, como ya se ha descrito en el apartado anterior.

Los efectos de la activación de la GCs obtenidos con los cuatro donadores estudiados, fueron dependientes de la concentración añadida de éstos compuestos (Fig 6), y el efecto máximo obtenido fue comparable en todos los casos, alcanzándose unos niveles de GMPc de unos 150 pmol por  $10^6$  células. Los tiempos de incubación con los compuestos donadores de NO, no fueron iguales para todos los compuestos, si no que se ajustó según los resultados obtenidos en el apartado anterior, para conseguir el tiempo al que la estimulación era máxima, y fueron de 15 minutos para SNAP, SPER/NO y SNP, mientras que el DEA/NO se midió a 10 min. de estimulación.





**Figura IV.6. Curvas dosis respuesta para la acumulación de GMPc en respuesta a donadores de NO.** Las células, sembradas a una densidad de  $10^6$  por pocillo, se preincubaron con IBMX 0,5 mM y después se estimularon con los donadores de NO a concentraciones crecientes. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos representados son una media  $\pm$  S.E. a partir de tres preparaciones celulares diferentes.

Gracias a este experimento se consiguieron establecer los valores de  $EC_{50}$  para los cuatro compuestos. El DEA/NO demostró ser el donador más potente, con una  $EC_{50}$  de  $0,38 \pm 0,02 \mu\text{M}$ . Una concentración del compuesto de tan solo  $0,1 \mu\text{M}$ , ya fue capaz de producir un incremento de los niveles de GMPc, obteniéndose un máximo de activación a  $2,5 \mu\text{M}$ . La adición de concentraciones mayores, de hasta  $25 \mu\text{M}$  ensayados, no fue capaz de originar mayores incrementos del nucleótido cíclico.

Los valores de  $EC_{50}$  y concentración de de cada donador para obtener el máximo o el umbral de activación, se representan en la tabla en concentraciones  $\mu\text{M}$  para cada compuesto.

**Tabla IV.2. Concentraciones de donadores de NO y el NO producido por ellos, que producen umbral de activación, activación máxima v estimulación**

Donador	Umbral de activación		de $EC_{50}$		Activación máxima	
	[Donador] $\mu\text{M}$	[NO] $\mu\text{M}$	[Donador] $\mu\text{M}$	[NO] $\mu\text{M}$	[Donador] $\mu\text{M}$	[NO] $\mu\text{M}$
<b>SNAP</b>	1	0.006	$317 \pm 42$	$1.8 \pm 0.2$	750	$3.8 \pm 0.4$
<b>SPER/NO</b>	0.05	0.02	$1.12 \pm 0.46$	$0.5 \pm 0.2$	5	$2.4 \pm 0.2$

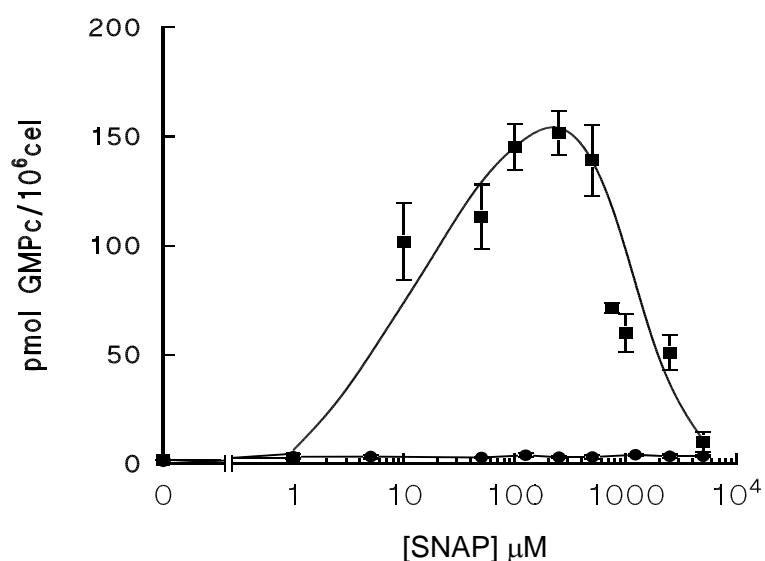
<b>DEA/NO</b>	<0.05	<0.05	0.38± 0.02	0.5± 0.1	2.5	2.2± 0.5
<b>SNP</b>	5	N.D.	36.3± 0.02	N.D.	100	N.D.

Es de particular interés el efecto que muestra el SNAP. Así como los otros donadores una vez alcanzado el máximo de activación no fueron capaces de incrementar los niveles de GMPc obtenidos, el SNAP muestra una disminución en dichos niveles al introducir concentraciones superiores a 1 mM.

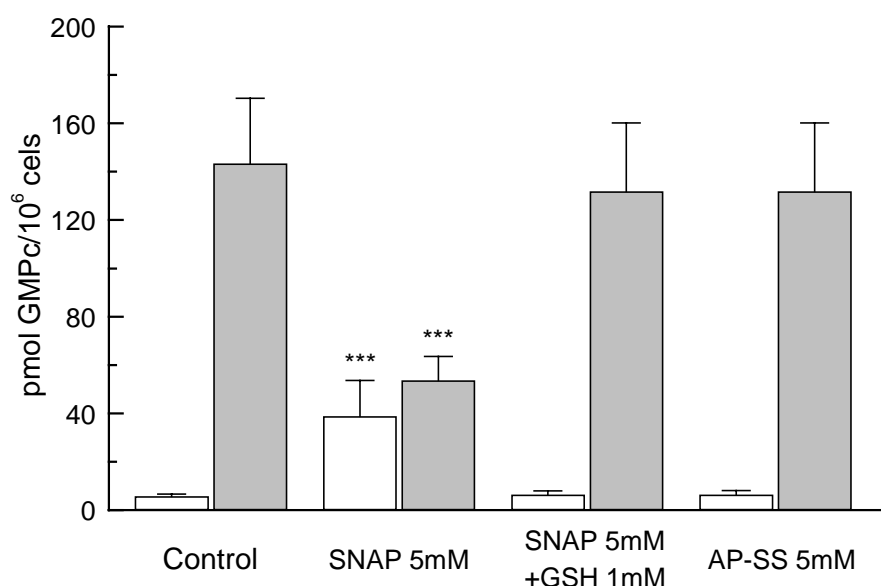
Se ha descrito que la presencia de glutatión reducido en el medio, da lugar a una facilitación de la liberación de NO a partir de nitrosotioles. Para comprobar si éste efecto aparecía en nuestro modelo, y si ello daba lugar a un cambio en la acumulación de GMPc por tratamiento con SNAP, se introdujo en el medio de incubación una concentración elevada de GSH. Como se muestra en la figura, el cotratamiento con SNAP y glutatión siguió el mismo comportamiento a dosis crecientes de SNAP que en ausencia de glutatión. A dosis altas de SNAP se previno el incremento en la acumulación de GMPc, llegándose a alcanzar niveles del nucleótido cíclico que representan tan sólo el 10% de la estimulación máxima obtenida. Sin embargo, la curva dosis respuesta se encuentra desplazada dos ordenes de magnitud a la izquierda respecto a la misma en ausencia del GSH. Esto apoya la idea de que el glutatión podría potenciar el efecto del SNAP, mejorando la liberación de NO. Esta potenciación del efecto de SNAP podría ser debida a que el glutatión reaccionara con el NO formando nitrosoglutatión, que se comporta como un reservorio de NO, prolongando así el tiempo que el NO permanece activo en el medio y capaz de provocar estimulación (Hogg et al., 1996; Chiueh et al, 1999).

De la misma manera y con el objeto de distinguir si la estructura disulfito resultante tras liberarse el NO era la responsable del efecto de inhibición observado, se procedió a realizar una incubación con el AP-SS. Este compuesto presenta la misma estructura química que el SNAP pero sin el NO<sup>•</sup>. Como se observa en la figura 7, el compuesto no produjo ningún efecto de activación, ni redujo los niveles basales.

Por otro lado, el AP-SS tampoco tuvo ningún efecto sobre la capacidad de activación de la enzima por otro donador de NO diferente. Los experimentos presentados en la figura 8, se realizaron por estimulación con SNP 100  $\mu$ M como fuente de NO, introducido conjuntamente con SNAP, AP-SS, o DMSO tras la preincubación con IBMX. Se comprobó que el DMSO a la concentración máxima que se introdujo en el medio (2,8%) no modificaba la capacidad de respuesta de la GCs. Del mismo modo, el análogo del SNAP carente de NO tampoco redujo esta respuesta, mientras que la misma concentración de SNAP, impidió el incremento de los niveles de GMPc por encima de aquellos que se obtenían con el SNAP directamente. Estos representan un 25% de la respuesta máxima obtenida con SNP 100  $\mu$ M.



**Figura IV.7. Dosis-respuesta a SNAP en presencia de GSH. Dosis-respuesta a AP-SS.** Tras la preincubación de 30 min con IBMX, se realizaron incubaciones de 15 min con el SNAP + GSH 1 mM (■) o bien AP-SS (●). Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado.



**Figura IV.8. Capacidad de activación de GCs.** Las células se preincubaron 30 min en presencia de IBMX y a continuación 15 min con el medio de estimulación sin (barras abiertas), o con SNP 100 $\mu\text{M}$  (barras grises). Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado.



### **3. ESTIMULACIÓN DE LA GCS POR YC-1.**

A continuación introdujimos un nuevo compuesto sintético, el YC-1, que se ha descrito como activador directo de la enzima GCs. Este compuesto, representa una herramienta muy útil para mantener a la enzima GCs activada sin introducir NO en el medio, evitando por lo tanto otros efectos reguladores que pueda tener el radical sobre los elementos de la ruta.

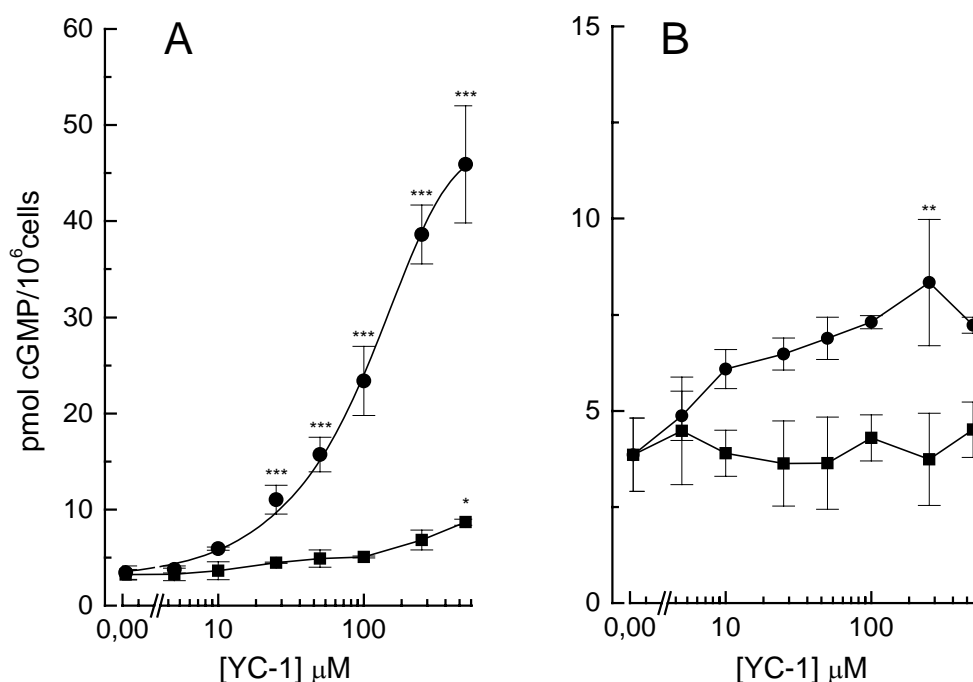
En primer lugar quisimos comprobar que, en nuestro modelo experimental, el YC-1 era capaz de elevar de forma efectiva los niveles de GMPc. Los experimentos se realizaron tanto en células cromafines como endoteliales. De esta forma pudimos comparar la capacidad de este compuesto de inducir activación en distintos tipos celulares, ya que se ha descrito que pueden existir diferencias muy importantes según el modelo con el que se trabaje (Wegener et al., 1997).

Para llevar a cabo estas medidas de activación de la enzima, la células cromafines se prepararon como en experimentos anteriores, retirando el suero 24 horas antes de la determinación de GMPc. Sin embargo, las células endoteliales, que se mantienen en cultivo con suero no inactivado, precisan de factores presentes en este medio para mantener íntegra su funcionalidad. Por ello, a estas células se les retiró el suero tan solo 4 horas antes de la estimulación, evitando así provocar alguna modificación en el estado celular por ausencia de dichos factores.

El día del ensayo las células se preincubaron durante 30 min con IBXM 0,5 mM, como se ha descrito anteriormente. A continuación se realizó la estimulación con YC-1. El medio de estimulación, solución Locke, contenía 3 mg/mL de BSA para permitir que, a altas concentraciones, el YC-1 se mantuviera estable en solución (según especificaciones del suministrador). El tiempo de estimulación fue de 10 min.

Como se muestra en la figura, la activación de la GCs se produce de forma dosis dependiente, tanto en células cromafines como en endoteliales. La  $EC_{50}$  calculada para el YC-1 en células cromafines fue de  $90,1 \pm 11,2 \text{ } \mu\text{M}$ . La introducción simultánea en el medio de estimulación de  $10 \text{ } \mu\text{M}$  ODQ con el objeto de inhibir la GCs, redujo los incrementos del nucleótido cíclico obtenidos con todas las concentraciones de YC-1 (fig 9, panel A). Estas observaciones demuestran que el YC-1 activa de forma directa a la enzima.

Sin embargo, las células endoteliales no mostraron una activación tan significativa como en el caso de las células cromafines (figura 9, panel B). A la máxima concentración de YC-1 utilizada, los niveles de GMPc no llegaron a triplicar los niveles basales. Al introducir el ODQ, la producción de GMPc se inhibió por completo, llegando incluso a alcanzar concentraciones inferiores a la basal.

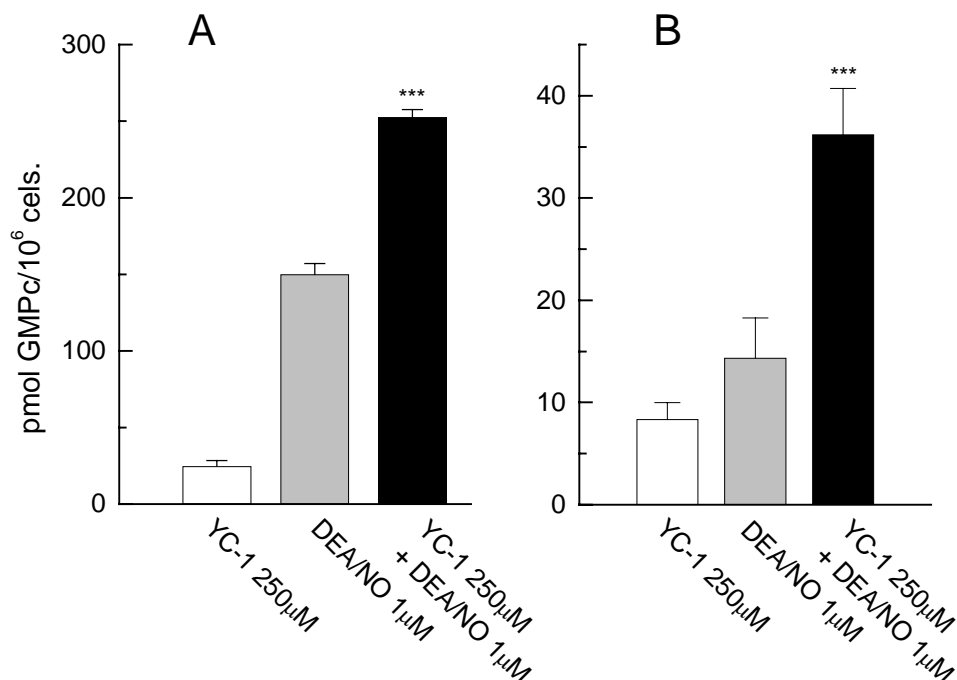


**Figura IV.9. Dosis-respuesta de YC-1 sobre los niveles de GMPc acumulados.** Estudio realizado en células cromafines (panel A) o endoteliales (panel B). Los experimentos se llevaron a cabo en ausencia (●) o presencia de ODQ 10  $\mu\text{M}$  (■). Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  SE de tres experimentos realizados en triplicado.

No fue posible estudiar el efecto de dosis mayores de YC-1 dado que, al realizar estimulaciones con concentraciones superiores a 500  $\mu\text{M}$ , las células perdieron adhesión a las placas donde se habían mantenido en cultivo. Este efecto no se debió a que la concentración de DMSO en el que se encuentra disuelto el YC-1 sea tóxica, ya que ésta no superó nunca el 2%.

A pesar de que las respuestas en ambos tipos celulares son muy diferentes en cuanto a su magnitud, quedó demostrado que en los dos casos el YC-1 es capaz de activar la síntesis de GMPc y que éste efecto es prevenido por tratamiento con el inhibidor de la GCs. Por lo tanto, el efecto del YC-1 está mediado por activación directa de la enzima.

Se quiso comprobar si la activación de la síntesis de GMPc a través de NO, tenía una respuesta comparable en los dos tipos celulares y, por tanto, las diferencias residían en su capacidad de ser activadas por YC-1 en particular, o si la ruta estaba expresada de forma diferente en ambos cultivos. Para ello introdujimos DEA/NO en cultivos de células cromafines y endoteliales a una concentración 1  $\mu\text{M}$ , que había producido la máxima estimulación en experimentos de dosis-respuesta.



**Figura IV.10. Efecto sinérgico de YC-1 con NO.** Las células se preincubaron con IBMX durante 30 min. A continuación se estimuló durante 10 min con YC-1, DEA/NO o ambos simultáneamente. Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado.

La figura muestra una capacidad de activación muy diferente en ambos modelos celulares, apareciendo una respuesta 16 veces superior en células cromafines que en endoteliales cuando estimulamos con NO. Esta diferencia puso de manifiesto una capacidad muy distinta de activación de la enzima GCs en los dos tipos celulares.

Por otro lado, se ha descrito con anterioridad una potenciación del efecto del NO por el YC-1 (Hwang et al., 1999; Becker et al., 2000). Según el mecanismo de acción propuesto para el YC-1, que se describe en la introducción, éste compuesto prolongaría el tiempo de unión de los activadores gaseosos de la GCs, el NO y CO, a la enzima. Esto conduciría, por tanto, a un tiempo de activación más prolongado, además del incremento descrito en la velocidad máxima de la enzima (Friebe & Koesling, 1998; Mülsch et al., 1997; Rothermund et al., 2000). La introducción simultánea del YC-1 junto con DEA/NO como fuente de NO produjo un incremento en los niveles de GMPc superior a los inducidos por cada uno de estos compuestos por separado. Además, estos incrementos fueron superiores a la suma de los efectos conseguidos por la estimulación con cada uno de ellos. De estos resultados podemos concluir que el YC-1 presenta efecto sinérgico con el NO en cuanto a la activación de la GCs, tanto en células cromafines como en endoteliales.

#### **4. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GCs**

Las reacciones de fosforilación representan uno de los mecanismos más extendidos en cuanto a la regulación de distintas respuestas biológicas. Esto implica la activación de una proteína quinasa, que a su vez fosforile a una proteína diana, modificando su estado y por tanto su actividad.

Según se ha descrito en la introducción, la ruta de activación NO-GCs tiene como uno de sus efectores de señalización a la PKG. Esta kinasa es activada por el GMPc y, una vez activa, es capaz de fosforilar a otras proteínas en residuos de serina y treonina modificando su actividad (Lincoln & Cornwell, 1993; Francis & Corbin, 1994b).

Para las formas particuladas de la guanilato ciclasa se ha descrito como la defosforilación de la enzima conduce a una desensibilización de la misma (Potter & Garbers, 1994; Potter, 1998). Estudios anteriores han mostrado que la GCs se puede fosforilar *in vitro* por proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) y de AMPc (PKA) incrementando su actividad (Zwiler et al, 1981, 1985; Louis et al. 1993). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido si la PKG, elemento de la ruta NO-GMPc, podría modular la actividad de la GCs.

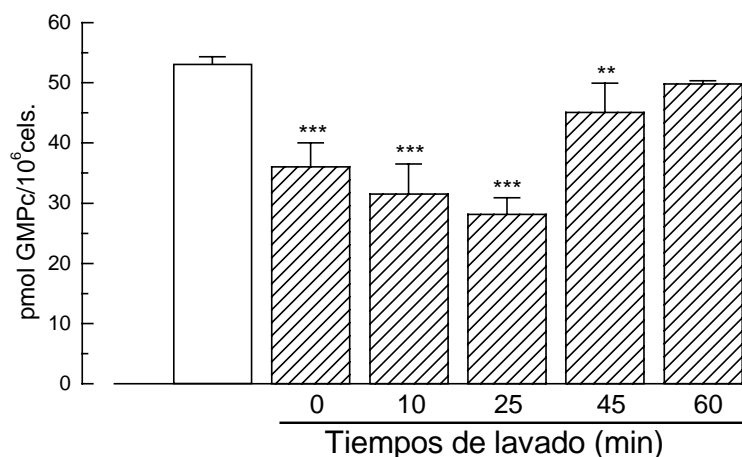
##### **4.1. DESENSIBILIZACIÓN DE LA GCs**

En estudios anteriores se ha visto que una activación con un donador de NO como el SNP, daba lugar a una “modulación negativa” dosis dependiente en una posterior respuesta a estimulación por este mismo compuesto (Papapetropoulos et al., 1996b). Sin embargo, en estos estudios no quedaba claro si este fenómeno era debido a un efecto del NO propiamente dicho, o si estaba mediado por el segundo mensajero, el GMPc.

Por ello, en primer lugar se realizaron experimentos encaminados a determinar si el incremento en los niveles de GMPc y la activación de la PKG modificaban la capacidad de respuesta a NO. Se incrementaron los niveles de GMPc con el péptido natriurético de tipo C (CNP), capaz de interaccionar con un receptor de membrana acoplado a una guanilato ciclasa particulada (Rodriguez-Pascual et al 1996). Para ello las células se incubaron durante 5 minutos con CNP 100 nM y posteriormente se estimularon con SNP 50  $\mu\text{M}$  15 min, manteniendo la actividad fosfodiesterasa inhibida.

La figura 11 muestra los resultados de la activación obtenida tras la estimulación realizada, bien a continuación de la preincubación con CNP, o bien realizando lavados intermedios con solución Locke en presencia de IBMX. Se observa como, haciendo una estimulación a continuación del tratamiento con CNP, la respuesta obtenida representa un 68% de la producida en células control no sometidas a preincubación con CNP. Al introducir tiempos de lavado de hasta 25 minutos entre la preincubación y la estimulación con NO, la respuesta se redujo a un 53% respecto al

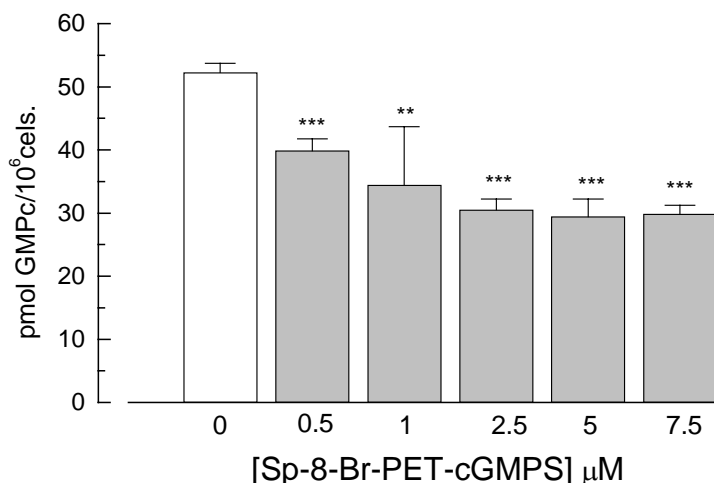
control. Cuando el tiempo de lavado fue mayor de 45 minutos, la capacidad de respuesta se fué recuperando y llegó a alcanzar niveles control.



**Figura IV.11. Inhibición de la respuesta a SNP por elevación previa de los niveles de GMPc.** Las células cromafines se estimularon con 50  $\mu$ M de SNP (barra abierta) en presencia de IBMX 0,5 mM; las barras rayadas muestran experimentos donde, previo a la estimulación con SNP, las células se habían sometido a incubación con CNP 5 min, dejando después un tiempo de lavado en ausencia de ningún agente estimulante (IBMX presente en el medio). Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados por triplicado.

Dado que el incremento en los niveles de GMPc intracelular era capaz de producir una desensibilización de la GCs a posteriores estimulaciones con NO, nos planteamos la cuestión de si este efecto era debido a una activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc. Para ello introdujimos un análogo permeable del nucleótido cíclico, el Sp-8-Br-PET-cGMPS, descrito como un activador potente y selectivo de la PKG. Las células se preincubaron con diferentes concentraciones de este compuesto en presencia de 0,5 mM IBMX durante 10 minutos, y después se estimularon con 50  $\mu$ M SNP o basal durante 15 minutos. Previo al radioinmunoensayo para la determinación del GMPc obtenido, se separó el análogo del GMPc como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura se muestra como el pretratamiento con el activador de la PKG resultó en una disminución de la síntesis de GMPc respecto al control cuando las células se estimularon con NO. El efecto mostró ser dosis dependiente. La activación de la GCs en respuesta a SNP se redujo en un 42,3% por tratamiento con 7,5  $\mu$ M Sp-8-Br-PET-cGMPS.

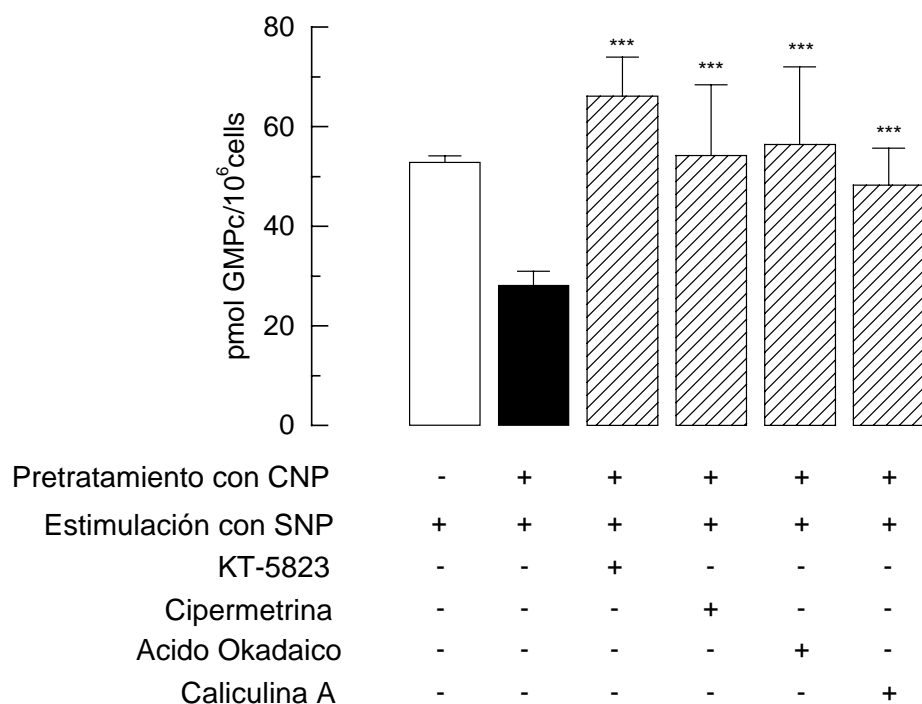


**Figura IV.12. Efecto de la activación de PKG sobre la acumulación de GMPc inducida por estimulación con SNP.** Las células se preincubaron con concentraciones crecientes del análogo de GMPc (barras grises) o control (barra abierta) en presencia de IBMX y a continuación se estimuló con SNP durante 15 min. Los valores presentados corresponden a los incrementos de GMPc tras sustraer los niveles basales como una media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados por triplicado.

Tras comprobar que la activación de la ruta daba lugar a una desensibilización de la GCs a un estímulo con NO y que este efecto podía estar mediado por la activación de la PKG, introdujimos inhibidores de ésta proteína quinasa y de proteínas fosfatasas alternativamente para determinar si se prevenía o potenciaba la desensibilización (figura 13).

Así comprobamos que, al introducir el KT-5823, inhibidor específico de PKG, conjuntamente con el CNP durante la preincubación, la respuesta a un estímulo posterior con SNP era de la misma magnitud que la del control. Este hecho reafirmó que la activación de la proteína kinasa G era responsable de la desensibilización de la GCs.

Además, se introdujeron inhibidores de Ser/Thr fosfatasas esperando que potenciaran el efecto inhibitor, dado que todo parecía indicar que éste se producía por una fosforilación de la GCs por PKG. Sin embargo, los inhibidores utilizados, el ácido okadaico, la caliculina A y la cipermetrina, no sólo no potenciaron este efecto, sino que lo previnieron. Aunque los tres compuestos revirtieron el efecto de la desensibilización, fue el efecto de la caliculina A el que presentó mayor significación estadística. Este hecho indica que, la proteína fosfatasa implicada en el efecto, es probablemente de tipo1 ó 2A.



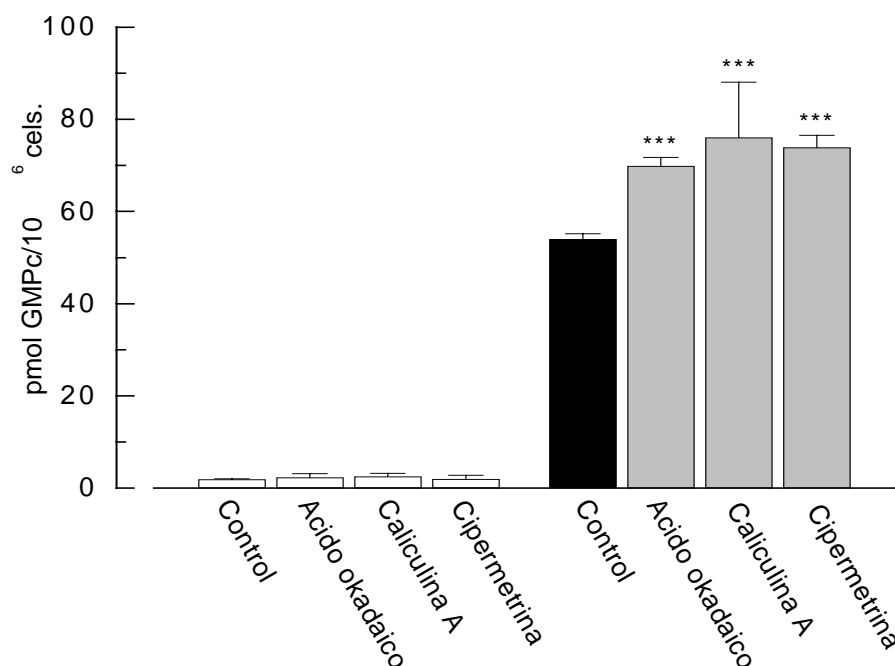
**Figura IV.13. Prevención de la desensibilización por inhibición de PKG o proteínas fosfatasa.** Las células se trataron con 100 nM CNP en un medio conteniendo IBMX 0,5 mM durante 10 min, seguido de un lavado de 25 min y estimulación con SNP 50  $\mu$ M 15 min. Se ensayaron los inhibidores KT-5823 0,5  $\mu$ M, ac. okadaico 100 nM, cipermetrina 10 nM ó caliculina A 10 nM, los compuestos estaban presentes durante todo el tiempo de incubación. Los valores presentados corresponden a los niveles de GMPc obtenidos por estimulación con el SNP, restándoles el basal, dado como media de tres experimentos realizados por triplicado  $\pm$  S.E. a partir de cultivos distintos. La significación estadística se calculó respecto a las células prestimuladas con CNP (barra negra).

#### 4.1.a. Implicación de las proteínas fosfatasa en la inhibición de GCs

Se estudió el efecto de las proteínas fosfatasa sobre la actividad GCs. Para ello, en una primera aproximación se introdujeron inhibidores de distintas proteínas fosfatasa y se midió la activación de la GCs en las células cromafines bovinas. Las células, se sometieron a una preincubación de 10 min con los inhibidores de proteínas fosfatasa en presencia de IBMX. Seguidamente se realizó una estimulación con SNP, comparando la acumulación de GMPc inducida en cada caso.

Como se muestra en la figura, los compuestos inhibidores de proteínas fosfatasa incrementaron de manera significativa y de forma similar entre ellos la capacidad de activación de la GCs. Los incrementos sobre el control de activación fueron de  $40,9 \pm 22\%$  en el caso de caliculina A, de  $28,9 \pm 3,5\%$  para ácido okadaico y de  $36,9 \pm 4,9\%$  para la cipermetrina. Estos compuestos no modificaron los valores de actividad

basal. Los resultados sugieren que existe en las células una actividad tónica de proteínas fosfatasa, que inhiben la actividad GCs sensible a NO.



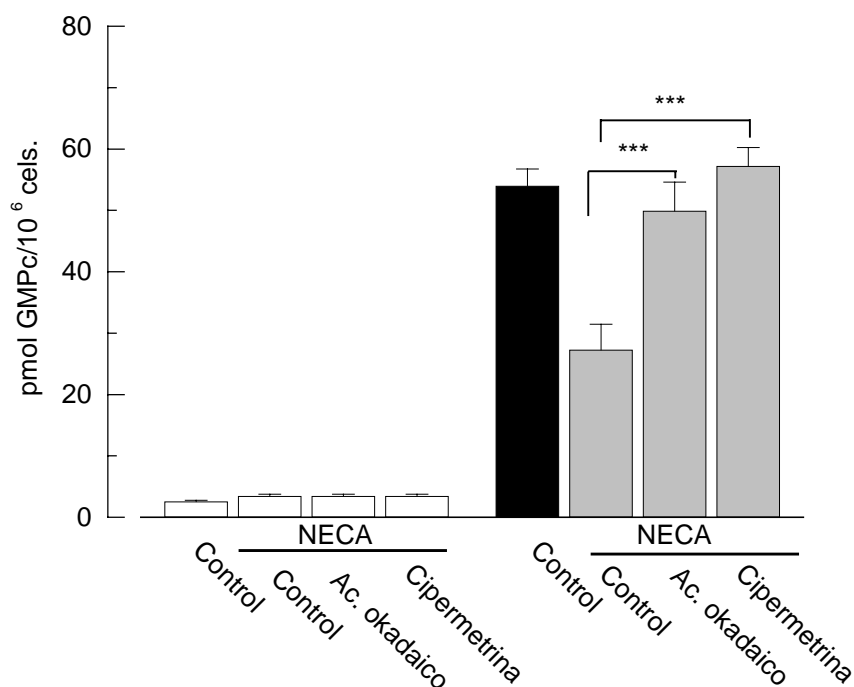
**Figura IV.14. Incremento de la acumulación de GMPc por inhibición de proteínas fosfatasa.** Las células se incubaron con 0,5 mM IBMX y los inhibidores de proteínas fosfatasa durante 10 min en el caso de caliculina A y 30 min el ácido okadaico y la cipermetrina. A continuación se estimuló con SNP 50  $\mu$ M (barras grises) ó basal (barras abiertas) durante 15 min. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos representados son una media  $\pm$  S.E. a partir de tres preparaciones celulares diferentes.

Aunque existen pocas herramientas farmacológicas que activen específicamente las proteínas fosfatasa, se ha descrito que el NECA (5'-(*N*-etilcarboxamido)adenosina) es un activador de la actividad de proteínas fosfatasa citosólicas en células cromafines, mediante la estimulación de un receptor de adenosina tipo A2b (Mateo et al., 1995; Casado et al., 1992). Se planteó si la activación de las proteínas fosfatasa afectaría, al igual que ocurría con su inhibición, a los niveles de GMPc, para lo cual se analizó el efecto de la preincubación con NECA sobre los niveles basales de GMPc y sobre la activación inducida por tratamiento con SNP.

Para este estudio se realizó una preincubación de 30 min con 100  $\mu$ M NECA, concentración que produce el máximo incremento en la actividad fosfatasa (Mateo et al., 1995). A continuación se realizó la estimulación con SNP 50  $\mu$ M o basal en presencia de 0,5 mM IBMX. Como se observa en la figura, los niveles basales de GMPc se incrementaron 1,5 veces en las células preincubadas con el NECA respecto al control. Por el contrario, los niveles de GMPc obtenidos por estimulación con SNP se redujeron un  $50,5 \pm 7,8\%$  en células pretratadas con NECA respecto al control.



La introducción de dos inhibidores de la actividad de proteínas fosfatasa durante el tiempo de incubación con el NECA, bien la cipermetrina 10 nM o bien ácido okadaico 100 nM, fueron capaces de prevenir esta reducción.



**Figura IV.15. Efecto de la activación de las proteínas fosfatasa sobre los niveles basales y estimulados de GMPc.** Tras la preincubación con NECA, las células se estimularon con SNP (barras grises) o basal (barras abiertas) en presencia de IBMX 0,5 mM durante 15 min. El tratamiento con ac. okadaico o cipermetrina se realizó durante la preincubación con NECA. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos representados son una media  $\pm$  S.E. a partir de tres preparaciones celulares diferentes.

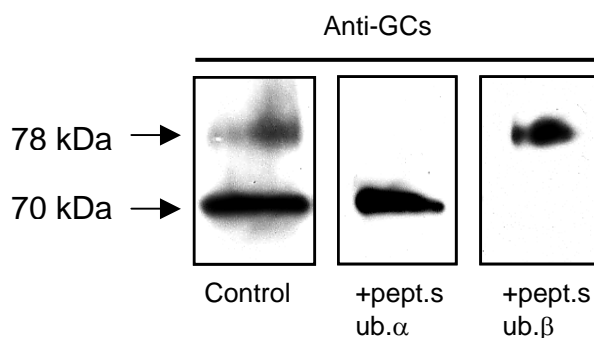
El hecho de que tanto el pretratamiento con CNP, como se ha visto en el apartado anterior, como la preincubación con NECA, redujeran la acumulación de GMPc inducida por SNP y que en ambos casos los inhibidores de fosfatasa citosólicas previnieran estos efectos, sugería que ambos compuestos podrían compartir un mecanismo común que fuera responsable de la modulación negativa.

Las células se preincubaron con ambos compuestos simultáneamente, NECA y CNP, para determinar si sus efectos eran acumulativos. Sin embargo, la inhibición causada por ambas drogas conjuntamente fue equivalente a la producida por cada una de ellas por separado, apoyando la idea de que ambos compuestos comparten un mismo mecanismo.

#### 4.1.b. Cambios en el nivel de fosforilación de la subunidad $\alpha$ de la GCs en respuesta a distintos tratamientos

Dado que, tanto la modificación de la actividad de la proteína kinasa G como de proteínas fosfatasas producían una inhibición en la actividad de la GCs, iniciamos el estudio del estado de fosforilación de las subunidades de la enzima, pensando que fuera la modificación de éste estado el causante de la disminución en la actividad.

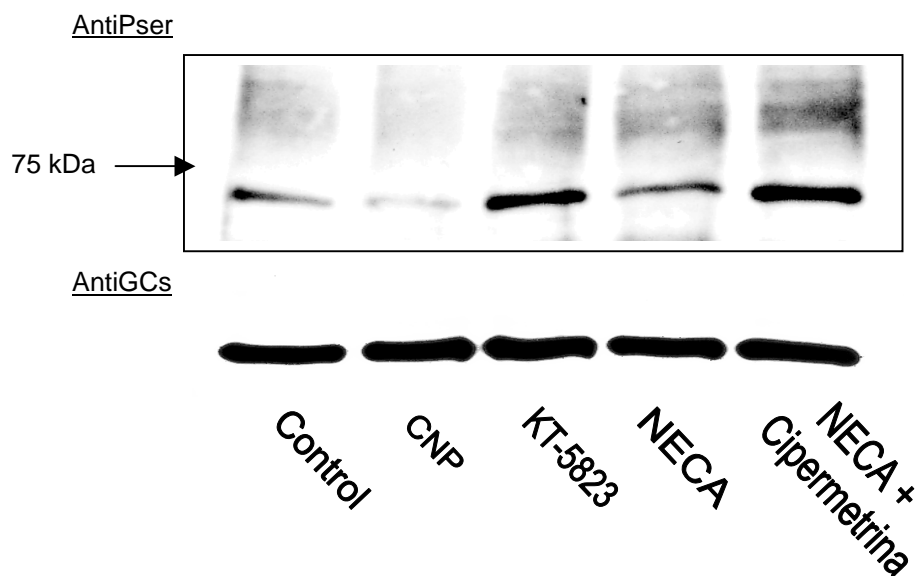
En primer lugar se realizó una inmunotransferencia a partir de extractos obtenidos de células cromafines, utilizando un anticuerpo policlonal para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la GCs. Así se detectaron dos bandas de peso molecular 78 y 70 kDa, correspondientes a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. La especificidad de estas dos bandas detectadas se comprobó introduciendo alternativamente el péptido correspondiente a cada subunidad. Estos péptidos se utilizan como inmunógenos para la generación del anticuerpo, y en este caso como bloqueantes de la unión del anticuerpo.



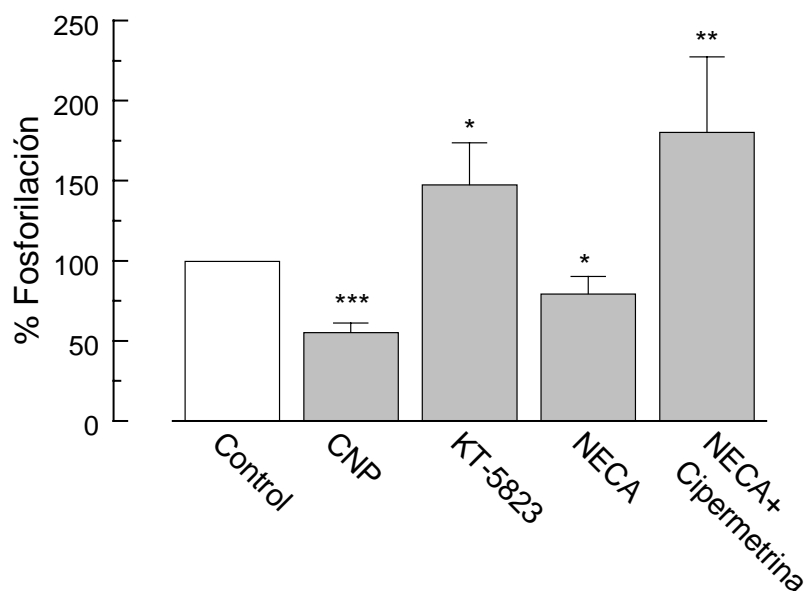
**Figura IV.16. Inmunodetección de GCs en extractos de células cromafines bovinas.** Se realizó una electroforesis de 20  $\mu$ g de GCs purificada y se transfirió la proteína a membranas de PVDF, detectando la GCs con 1  $\mu$ g/mL de anti-GCs sólo (control) o previamente incubado con 60 ng/mL de péptido  $\alpha$  u 80 ng/mL de péptido  $\beta$ . Las flechas indican la posición de las bandas correspondientes a los pesos moleculares de 70 y 78 kDa. Los pesos moleculares se calcularon utilizando patrones coloreados de precisión y amplio espectro (Bio-Rad).

Seguidamente se estudió si la modificación de las actividades de proteínas quinasas y fosfatasas afectaban al estado de fosforilación de la enzima GCs. Para ello ésta se inmunoprecipitó a partir de extractos solubles de células cromafines, como se ha descrito en materiales y métodos. Se realizó la electroforesis e inmunotransferencia de los precipitados, y la detección con anticuerpos contra residuos fosforilados en serina, treonina y tirosina. Aunque en experimentos de inmunodetección (Western Blots) el anticuerpo reconoce ambas subunidades de la enzima, la inmunoprecipitación se produce de la subunidad  $\alpha$  preferentemente, como se comprueba según el peso molecular de la banda detectada. El marcaje con anticuerpos anti-fosfotreonina y anti-fosfotirosina no reveló inmunorreactividad en el

inmunoprecipitado. Sin embargo, cuando se utilizaron anticuerpos anti-fosfoserina, apareció inmunorreactividad en la banda correspondiente al peso molecular de la subunidad  $\alpha$ .



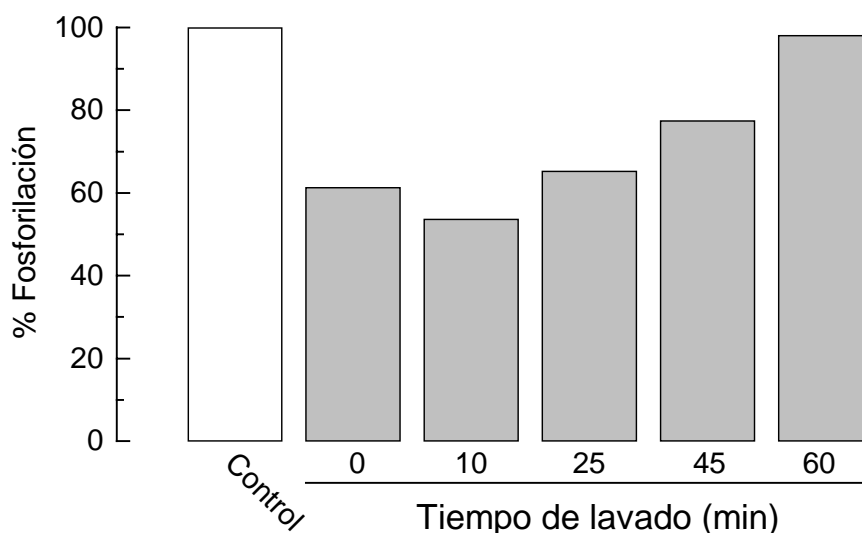
**Figura IV.17.A. Análisis de la GCs inmunoprecipitada.** En el panel superior aparece la imagen de un experimento representativo detectando residuos de Ser fosforilados (anticuerpo clon 4 A9) en GCs inmunoprecipitada de células sometidas a distintos tratamientos. El panel inferior muestra el resultado de la incubación de la misma membrana con anti-GCs.



**Figura IV.17.B. Estado de fosforilación de la GCs.** Resultados de los análisis densitométricos de las inmunodetecciones representados como la media  $\pm$  S.E. de tres experimentos diferentes. Los valores están normalizados según la cantidad de fosforilación y de proteína GCs detectada, calculando el cociente en cada experimento (anti-fosfoserina/antiGCs) para corregir las variaciones en la carga.

Como se observa en la figura 17, la subunidad  $\alpha$  estaba fosforilada en condiciones basales y el nivel de fosforilación disminuyó a un  $55,3 \pm 5,7\%$  respecto al control cuando las células se preincubaron con CNP durante 5 min seguido de 25 min de lavado. En células tratadas con NECA durante 30 min, la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  disminuyó un 20% aproximadamente, mientras que la preincubación con KT-5823 produjo un incremento en la fosforilación detectada de 1,7 veces el valor del control. Por otro lado, la incubación con NECA y cipermetrina simultáneamente, duplicó los valores de fosforilación del control. La estimación de estos valores se obtuvo haciendo un cociente con los datos de la densitometría de las membranas incubadas con anticuerpos anti-fosfoserina, normalizando el valor respecto a la cantidad de GCs detectada por el anticuerpo específico en estas mismas membranas.

Paralelamente se realizó una estimación del estado de fosforilación a lo largo del tiempo, para determinar si esta modificación de la proteína era responsable del cambio en la actividad presentada en la figura 11. Tal y como se describió en el apartado anterior, las células se incubaron durante 5 min con CNP 100 nM en presencia de IBMX, seguido de un periodo de lavado variable tras el cual se estudió su estado de fosforilación mediante inmunoprecipitación e inmunodetección con anticuerpos anti-fosfoserina. La preincubación con CNP produjo una disminución de la fosforilación de la enzima GCs. Este estado se mantenía hasta 25 min después de la preincubación, y después la fosforilación comenzaba a recuperarse volviendo a niveles similares a los obtenidos en condiciones de no estimulación.

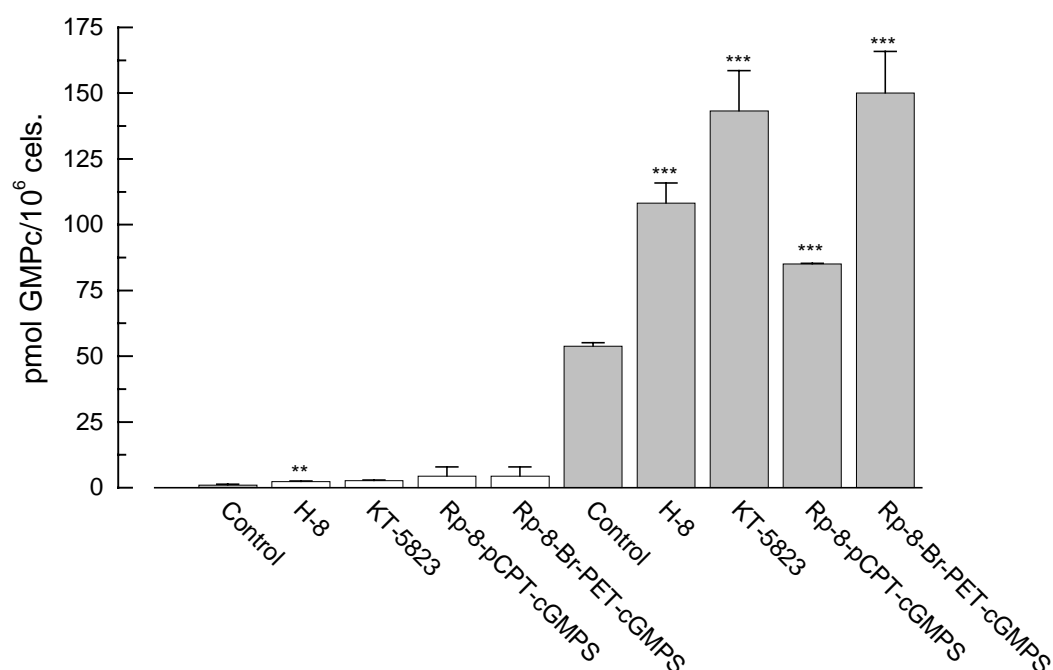


**Figura IV.18. Estado de fosforilación de la GCs en función del tiempo.** Cociente de la integración de los volúmenes de inmunodetecciones de residuos de serina fosforilados respecto a la cantidad de GCs en la misma membrana. Los resultados se representan como porcentajes respecto a un control no tratado (barra abierta). Las células se preincubaron con 100 nM CNP (barras grises), seguidas de periodos de lavado. Tras lisar las células se inmunoprecipitó la GCs y se realizó una electroforesis y transferencia a membrana. Se reveló el blot con anti-fosfoserina y se reprobó con anti-GCs. Los valores representados corresponden a un experimento representativo.

#### 4.1.c. Efecto de la inhibición de PKG sobre los niveles de GMPc inducidos por SNP

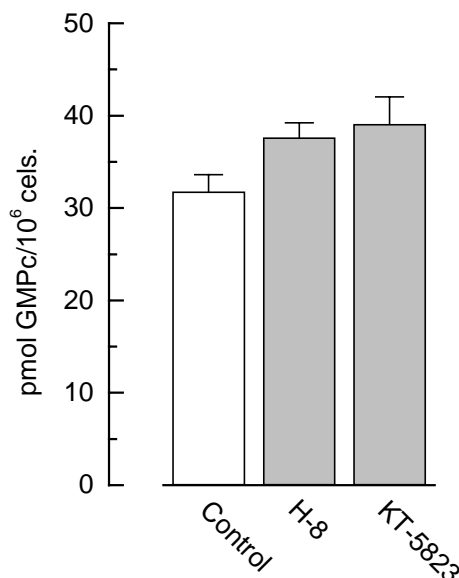
Se ha observado que la inhibición de la PKG por KT-5823 no sólo prevenía el efecto inhibitorio del CNP, sino que era capaz de incrementar el nivel de fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de la GCs. Por ello se procedió a estudiar el efecto de éste y otros inhibidores de PKG tanto sobre los niveles basales de GMPc, como en los estimulados por SNP.

Los cuatro inhibidores de PKG ensayados produjeron un incremento en los niveles de GMPc inducidos por NO. Como se puede apreciar en la figura 19, el orden de potencias de los inhibidores reveló que el KT-5823 presenta un efecto equivalente al del análogo de GMPc, el Rp-8-Br-PET-cGMPS. A su vez, ambos compuestos demostraron ser más potentes que el H-8, y éste más que el otro análogo de GMPc ensayado, el Rp-8-pCPT-cGMPS. El hecho de que la inhibición de la PKG tenga un efecto potenciador sobre la acumulación de GMPc en las condiciones basales revela que existe una activación tónica de PKG en condiciones de no estimulación. Además, la inhibición de la enzima quinasa produce un incremento muy significativo de la activación de GCs.



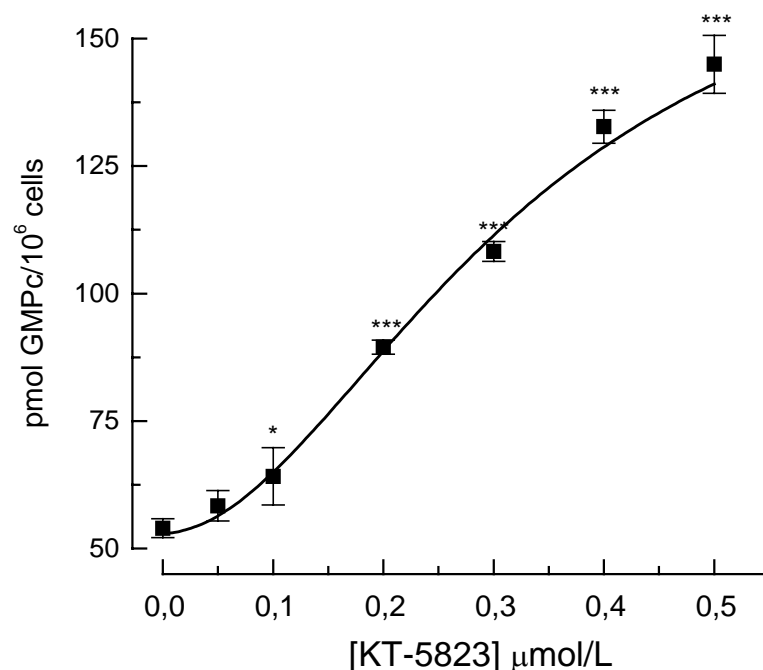
**Figura IV.19. Efecto de la inhibición de PKG sobre los niveles de GMPc.** Las células se trataron con 2 $\mu$ M H-8, 0,5  $\mu$ M KT-5823 y 5  $\mu$ M Rp-8-pCPT-cGMPS durante 30 min y 0,5 $\mu$ M Rp-8-Br-PET-cGMPS durante 10 min en solución Locke con 0,5 mM IBMX. Tras el periodo de preincubación, se realizó una estimulación con SNP 50  $\mu$ M (columnas grises) o medio basal (columnas abiertas) durante 15 min. La figura muestra la media de cuatro experimentos realizado en triplicado  $\pm$  S.E. a partir de cultivos distintos.

Para comprobar si la potenciación observada era debida a un efecto específico sobre la GCs, se estudió si la inhibición de PKG tenía algún efecto sobre la respuesta a CNP. Como se observa en la figura 20, los niveles de GMPc alcanzados por activación de la guanilato ciclasa particulada no se vieron modificados por el estado de activación de la PKG. Por ello podemos concluir que los efectos observados son debidos a cambios en la actividad de GCs.



**Figura IV.20. Efecto de la inhibición de PKG sobre la actividad de GC particulada.** Las células se trataron con 2 $\mu$ M H-8, 0,5  $\mu$ M KT-5823 o basal durante 30 min en solución Locke con 0,5 mM IBMX. Tras el periodo de preincubación se realizó una estimulación con CNP 100 nM durante 10 min. La figura muestra la media de cuatro experimentos realizado en triplicado  $\pm$  S.E. a partir de distintos cultivos.

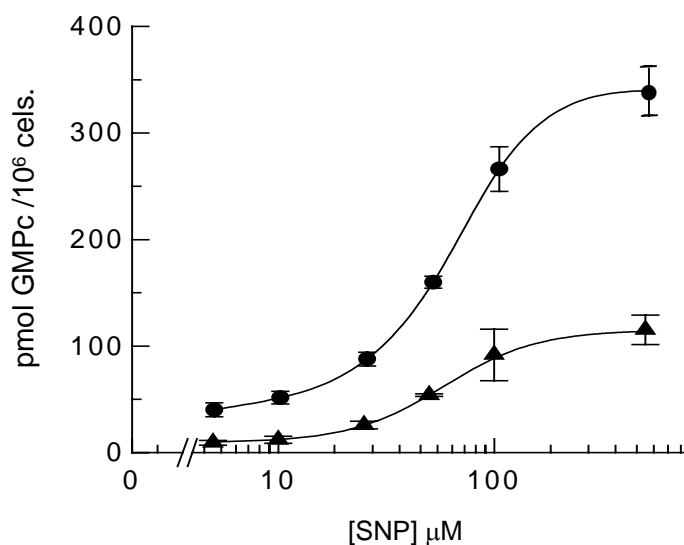
Dado que la inhibición de PKG potenciaba la respuesta de la GCs a NO, procedimos a comparar la eficacia del KT-5823 para incrementar los niveles de GMPc inducidos por la activación con SNP, con su potencia en la inhibición de PKG. Para ello realizamos experimentos de dosis respuesta en los que las células se incubaron durante 30 min con concentraciones crecientes de KT-5823 y posteriormente se estimularon con el SNP 50  $\mu$ M. Como se muestra en la figura 21, las concentraciones crecientes de inhibidor dieron lugar a una mayor síntesis de GMPc por parte de la GCs a igualdad de estímulo, estableciéndose una EC<sub>50</sub> de 240  $\pm$  5 nM. Este valor se corresponde con el descrito por Grider et al. para la inhibición de PKG (K<sub>i</sub>= 234 nM) (Grider et al., 1993). Estos resultados apoyan la idea de que la actividad de PKG modifica la capacidad de activación de GCs.



**Figura IV.21. Representación del incremento de respuesta a SNP en función de la inhibición de la PKG por dosis crecientes de KT-5823.** Las células se preincubaron 30 min en presencia de 0,5 mM IBMX y dosis crecientes de KT-5823 (hasta 0,5  $\mu\text{M}$ ; dosis mayores provocaron una pérdida de adhesión de las células a la superficie de cultivo). Después se estimularon 15 min con SNP 50  $\mu\text{M}$  manteniendo el inhibidor de PKG. Los resultados se representan como media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados por triplicado a partir de cultivos diferentes.

Los mayores incrementos en GMPc producidos por estimulación de GCs con SNP podrían ser debidos a una mayor sensibilidad de la enzima al NO, o podrían afectar a los parámetros cinéticos de la enzima respecto a su sustrato, el GTP. Por ello se trató de esclarecer cual era el mecanismo realizando dos curvas dosis-respuesta para SNP, en presencia y ausencia de KT-5823 0,5  $\mu\text{M}$ . Los experimentos se realizaron como en el caso anterior, preincubando las células durante 30 min con el inhibidor de PKG, seguido de una estimulación de 15 min con SNP a concentraciones crecientes y así se calcularon las  $\text{EC}_{50}$  para cada una de las condiciones. Estos experimentos resultaron en una  $\text{EC}_{50} = 58,3 \pm 2,1 \mu\text{M}$  para SNP en ausencia de la inhibición de PKG y  $\text{EC}_{50} = 61,4 \pm 3,03 \mu\text{M}$  cuando la proteína quinasa había sido previamente inhibida. Como se observa en la figura, el KT-5823 fue capaz de incrementar la acumulación de GMPc inducida por todas las concentraciones de SNP ensayadas, alcanzándose un máximo de activación con una concentración de SNP equivalente en ambas condiciones del ensayo. Estos resultados muestran que, las cantidades de NO necesarias para producir una activación submáxima y máxima de GCs, no se ven modificadas por la inhibición de PKG, indicando que el estado de fosforilación de la enzima no afecta a la interacción hemo-NO, y que las diferencias observadas en la

activación de ésta pueden ser debidas a la modificación de los parámetros cinéticos de la enzima respecto a su sustrato.



**Figura IV.22. Curvas dosis respuesta para los niveles de GMPc inducidos por SNP en presencia o ausencia de KT-5823.** Las células se preincubaron durante 30 min en presencia (círculos) o ausencia (triángulos) de 0,5 mM KT-5823 y se estimularon con dosis crecientes de SNP durante 15 min. Los resultados presentados corresponden a una media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados en triplicado a partir de cultivos diferentes.

#### 4.1.c.1. Relación de la inhibición de PKG y Ser/Thr proteínas fosfatasa

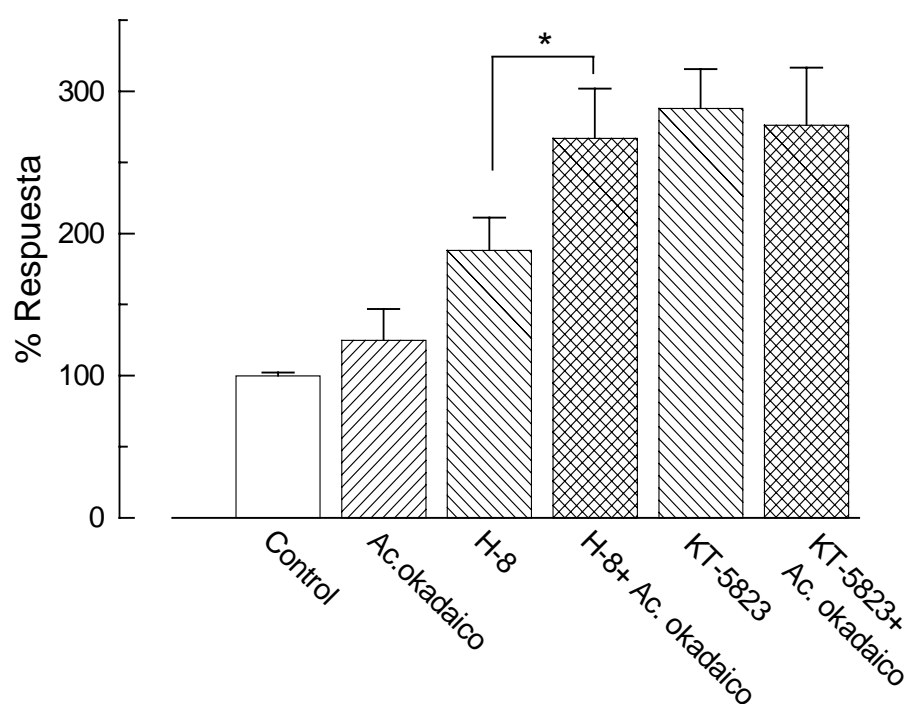
Dado que, tanto la inhibición de PKG como la de Ser/Thr proteínas fosfatasa originaban un incremento en los niveles de GMPc inducidos por SNP, se ensayó la combinación de ambos tipos de inhibición. Este tipo de experimentos pretendió determinar si los dos tipos de enzimas, que habían demostrado tener un efecto sobre la actividad de GCs, actuaban al mismo nivel o si presentaban efectos independientes, y por lo tanto sumatorios. Para ello, como se muestra en la figura, se introdujeron tres inhibidores de PKG diferentes, así como dos inhibidores de proteínas fosfatasa.

Como se puede observar en la figura 23, entre los dos inhibidores de PKG introducidos, el KT-5823 induce una mayor potenciación de la respuesta a SNP que el H-8, lo cual se puede explicar por la mayor selectividad y especificidad del KT-5823 respecto a la PKG. Este resultado apoya la idea de que la actividad de la PKG conlleva una inhibición de la actividad GCs, con lo cual su inhibición conduce a la potenciación de la respuesta a NO.

Por otro lado, el tratamiento con ácido okadaico, inhibidor de la actividad fosfatasa, conduce a una pequeña potenciación de la respuesta a NO, de lo cual se puede deducir que la actividad tónica de estas fosfatasa también produce una inhibición de



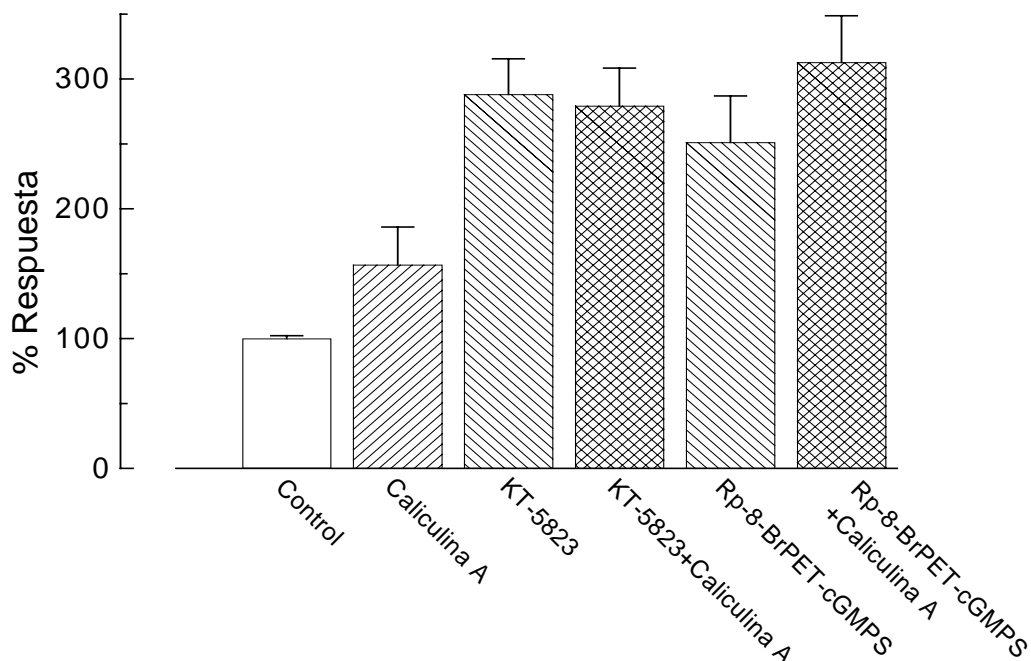
GCs. Sin embargo, la combinación de cualquiera de los inhibidores de PKG con el ácido okadaico, alcanza el mismo nivel de activación de la GCs, a pesar de que el KT-5823 y el H-8 presentan efectos de distinta magnitud por sí mismos. Por una parte, el hecho de que la inhibición de PKG por KT-5823 conjuntamente con la de la actividad fosfatasa no supere el nivel de activación obtenido con el primero, indica que la inhibición completa de la PKG bloquea de por sí la ruta de modulación de la actividad GCs. Además, el hecho de que el cotratamiento de H-8 con el ácido okadaico potencie el efecto del primero hasta alcanzar el mismo nivel que el producido por el KT-5823, no viene sino a confirmar que, tanto la PKG como la actividad fosfatasa están implicadas en la modulación del estado de la GCs y que la activación de cada una de ellas está relacionada con el de la otra.



**Figura IV.23. Efectos de la combinación de inhibidores de fosfatasas y PKG sobre el incremento de GMPc inducido por SNP.** Los inhibidores de PKG, H-8 2  $\mu$ M y KT-5823 0,5  $\mu$ M, se incubaron con las células 30 min en presencia de IBMX 0,5 mM. A continuación se estimularon con SNP 50  $\mu$ M durante 15 min. El mismo protocolo se aplicó para el inhibidor de fosfatasas, ácido okadaico 100 nM y la combinación de ambas clases de inhibidores. Los valores de GMPc obtenido se compararon con un control de estimulación sin ningún pretratamiento (barra abierta). La figura muestra la media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado con distintos cultivos. La diferencia entre todos los tratamientos y el control son muy significativas ( $p < 0.001$ ).

Siguiendo con el estudio, se probaron los efectos de otro inhibidor de fosfatasas, la caliculina A, sola y en combinación con el ya ensayado KT-5823. También se introdujo un inhibidor de PKG análogo de GMPc, el Rp-8-Br-PET-cGMPS. Como se puede ver en la figura, los resultados fueron similares a los obtenidos en el ensayo anterior. Tanto la caliculina A, como el Rp-8-Br-PET-cGMPS produjeron un incremento de la respuesta a SNP, siendo superior el efecto cuando era la PKG la que

se bloqueaba directamente. Además, la inhibición simultánea de PKG y proteínas fosfatasa no superó la potenciación de la respuesta obtenida con KT-5823 ó Rp-8-Br-PET-cGMPS, indicando de nuevo la existencia de un mecanismo común de modulación de la actividad GCs.



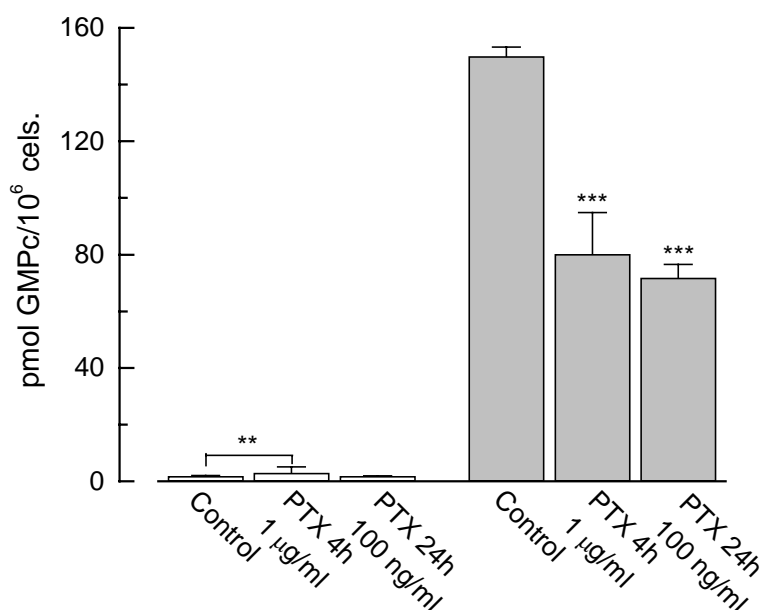
**Figura IV.24. Efecto de la inhibición de proteínas fosfatasa y PKG sobre los incrementos de GMPc inducidos por SNP.** Los inhibidores de PKG, Rp-8-Br-PET-cGMPS 0,5  $\mu$ M y KT-5823 0,5  $\mu$ M, se incubaron con las células 30 min en presencia de IBMX 0,5 mM. A continuación se estimularon con SNP 50  $\mu$ M durante 15 min. El mismo protocolo se aplicó para el inhibidor de fosfatasa, caliculina A 50 nM y la combinación de ambos inhibidores. Los valores de GMPc obtenido se compararon con un control de estimulación sin ningún pretratamiento. Los resultados se expresan como porcentaje de respuesta. La figura muestra la media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado con distintos cultivos. La diferencia entre todos los tratamientos y el control son muy significativas ( $p < 0.001$ ).

#### 4.2. EFECTO DE LA TOXINA PERTÚSICA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE GMPc

Se ha descrito con anterioridad que la subunidad  $\beta$  de la enzima guanilato ciclasa soluble, purificada a partir de pulmón bovino, es susceptible de sufrir ADP ribosilación (Tomita et al., 1997). Por este motivo y con el objeto de describir si ésta modificación de la enzima podría ser otra de las formas de regulación de GCs, se probó el efecto de la toxina pertúsica sobre la respuesta a NO.

Así, se realizaron experimentos en los que se preincubaron células cromafines con toxina pertúsica a una concentración de 1  $\mu$ g/mL durante 4 horas, o bien 100 ng/mL durante 24 horas. A continuación se sometió a estas células a una estimulación con

un donador de NO, el DEA/NO 1  $\mu$ M durante 10 min, que origina una acumulación máxima de GMPc, según se ha visto en capítulos anteriores de resultados. En la figura 25 se aprecia como ambos tratamientos con la toxina originaron una reducción de la respuesta a NO de aproximadamente un 50% respecto al control. Además, los valores conseguidos con ambas condiciones de tiempo y concentración, resultaron ser muy similares. Es decir, el tratamiento con toxina pertúsica originaba sobre la actividad de GCs un efecto inhibitor. Este efecto inhibitorio sobre la producción de GMPc estimulada por NO, no ha sido observada en experimentos realizados con la enzima purificada. Esta discrepancia podría ser explicada por el hecho de que el tratamiento de las células con toxina pertúsica produce ADP-ribosilación de diferentes proteínas G; del tipo  $G_i$  (Stryer & Bourne, 1986; Sontag et al., 1991). La ADP-ribosilación de estas proteínas podría alterar otras vías de señalización, que sean responsables de la inhibición observada. Esto plantea la posibilidad de que la ADP-ribosilación de proteínas G desencadene algún cambio a nivel de segundos mensajeros que, a través de diferentes rutas señalizadoras, diera lugar a la inhibición de la producción de GMPc inducida por NO.



**Figura III.25. Efecto de Toxina Pertussis sobre la acumulación de GMPc inducida por DEA/NO.** Las células se preincubaron con las concentraciones de toxina y los tiempos indicados. A continuación se lavaron dos veces y se estimularon durante 10 min con DEA/NO 1 mM en presencia de IBMX 0,5 mM o basal (0,5 mM IBMX). Los resultados presentados son la media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado a partir de distintos cultivos.

Por otro lado se observó que el tratamiento de 4 horas había producido un incremento sobre los niveles basales de GMPc. Este hecho se correlaciona con el descrito por otros autores de activación de la GCs de forma independiente de NO, por ADP-ribosilación directa de la enzima (Tomita et al., 1997; Sanchez-Margalet et al., 1994 y 1996). Esto conduciría a un incremento de los niveles de GMPc,

desencadenando la activación de la proteína quinasa G, que como se ha demostrado en el apartado anterior, conduce a la inhibición de la actividad GCs.

## **5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGENTES ESTIMULADORES DE LA RUTA DURANTE PERIODOS PROLONGADOS**

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, la actividad de la enzima GCs está regulada por el estado de fosforilación de ésta. Este mecanismo de regulación se manifiesta tras periodos cortos de estimulación de la enzima, y la inhibición de la misma desaparece unos 45-60 min tras retirar el agente estimulante. Sin embargo, cuando se somete a pacientes con deficiencias cardiovasculares a tratamientos con donadores de NO, aparece el fenómeno descrito como tolerancia. A pesar de que se trata de un problema bien definido e identificado en el caso de tratamientos *in vivo*, no se ha descrito cual es el mecanismo molecular responsable del mismo. Por ello, en este capítulo el objetivo será estudiar el posible mecanismo a nivel de la ruta NO-GMPc-PKG.

Dado que la GCs es la enzima responsable del incremento en los niveles de GMPc, se podría pensar que ésta enzima fuera también el punto donde se produce la regulación de la vía (Kharitonov et al., 1997). Además, estudios anteriores han demostrado que el tratamiento con NO da lugar a una menor respuesta de la GCs a una nueva estimulación con NO. En sentido contrario se ha encontrado que una inhibición de la síntesis endógena de NO, conduce a una mayor sensibilidad de la enzima GCs a estimulación por NO (Moncada et al, 1991b; Papapetropoulos et al., 1996b).

Aunque el mecanismo implicado en este fenómeno todavía no se conoce, se ha postulado que la oxidación de determinados grupos tioles de la proteína podrían explicar la desensibilización de la misma.

También se ha barajado en múltiples ocasiones la posibilidad de que exista una disminución en los niveles de proteína, es decir, una menor cantidad de GCs, después de someter a las células a tratamientos con NO durante periodos prolongados de tiempo ( Baltrons & García, 1999).

Como fuente de NO se ha utilizado un donador de la familia de los NONOatos, el DETA/NO, que en medios a pH fisiológico y a 37°C tiene una vida media de 20 horas y una estequiometría de 2 moléculas de NO por molécula de DETA/NO. El donador de NO se renovó en el medio de cultivo cada 24 horas en el caso de estimulaciones de 48 horas y superiores. Teniendo en cuenta la velocidad de descomposición, la estequiometría, la constante de oxidación y la concentración de O<sub>2</sub>, con una concentración de donador de 50  $\mu$ M se estaría manteniendo una concentración de NO en torno a 0,7  $\mu$ M. La incubación con NO se lleva a cabo en ausencia de inhibidores de fosfodiesterasas.

### 5.1. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GCs TRAS TRATAMIENTOS PROLONGADOS CON NO O YC-1

En primer lugar se estudió si la capacidad de activación de la enzima GCs se veía modificada por el tratamiento con el donador de NO, DETA/NO, durante tiempos de 24 y 48 horas.

Para ello se mantuvieron las células en el medio de cultivo, al que se añadieron diferentes concentraciones del donador DETA/NO. El suero se retiró del medio de incubación 24 horas antes de realizar la medida. Transcurrido el periodo de tratamiento, se midió la cantidad de GMPc acumulado por las células, así como la cantidad de segundo mensajero que era capaz de sintetizar la enzima en respuesta a un estímulo con NO en forma de DEA/NO  $1 \mu\text{M}$  durante 10 min en presencia de IBMX.

Los valores de nucleótido cíclico detectados tras 24 y 48 horas de tratamiento con el NO, presentaron un incremento moderado respecto al valor basal de células no tratadas. Sin embargo, la respuesta al estímulo presentó diferencias muy significativas, como se observa en la tabla que resume los resultados obtenidos. Además, paralelamente se realizó un control del estado celular, para evitar que las diferencias en la actividad de la enzima pudieran estar influidas por una pérdida de células, o una toxicidad del agente estimulante. La cuantificación de proteínas reveló que no existía una pérdida de células.

**Tabla IV.3. Efecto del tratamiento prolongado con NO sobre la actividad GCs**

	%Actividad	%Actividad
Tratamiento (conc.)	24 h tto.	48 h tto.
DETA/NO $5 \mu\text{M}$	$67,5 \pm 1,6$	$68 \pm 1,7$
DETA/NO $10 \mu\text{M}$	$71,5 \pm 6,2$	$73,8 \pm 4$
DETA/NO $25 \mu\text{M}$	$65,4 \pm 5,03$	$63,3 \pm 2,1$
DETA/NO $50 \mu\text{M}$	$65,1 \pm 4,5$	$41,07 \pm 7,5$

Los resultados presentados en la tabla corresponden a una media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado a partir de distintos cultivos.

Mediante tinción con azul tripan y por un estudio de viabilidad celular (ver Materiales y Métodos), se excluyó que las diferencias observadas se debieran a un menor número de células. A los valores originales se les restó la cantidad de GMPc que aparece en condiciones basales, y se corrigieron respecto a cantidad de proteína cuantificada en cada una de las condiciones. El valor control expresado en pmoles de

GMPc por mg de proteína fue considerado como el 100% de activación, refiriéndose a éste los demás valores presentados.

Una vez comprobado que tras someter a la GCs soluble a dosis de NO que mantienen la ruta activada durante tiempos largos, su capacidad de respuesta se ve significativamente disminuida, comprobamos si este efecto era mediado por la propia actividad de la enzima. Para ello, repetimos el mismo estudio utilizando como agente estimulante el YC-1, cuya capacidad de activar la ruta ha sido previamente demostrada, considerando que su efecto está mediado por activación directa de la GCs.

Así, se sometieron las células en cultivo a tratamientos con dosis crecientes de YC-1 durante 24 y 48 horas. Durante estos periodos de incubación no se retiró el suero del medio, dado que el compuesto precisa de la presencia de éste para mantener su solubilidad, como se ha explicado en materiales y métodos. Al igual que en el apartado anterior, tras la preincubación con el agente, las células se sometieron a un estímulo de 10 min con DEA/NO  $1 \mu\text{M}$  en presencia de IBMX.

Los valores de GMPc detectados en las células tratadas con YC-1, pero no sometidas a la estimulación posterior con DEA/NO fueron 1,52; 2,04 y 2,5 veces el valor del basal no tratado, en incubaciones con YC-1 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  respectivamente durante 24 horas. En tratamientos de 48 horas, estos incrementos del nivel basal fueron de 2,3; 2,28 y 2,13 veces a las concentraciones especificadas.

La característica propia del YC-1 de potenciar los efectos del NO, obligó a tomar unos controles de estimulación particulares para cada concentración de YC-1 ensayada. Estos controles se hicieron introduciendo la concentración de DEA/NO que se utiliza para la estimulación, junto con la concentración de YC-1 presente en cada una de las condiciones de preincubación. Los niveles de GMPc obtenidos tras 10 min de estímulo fueron los valores de referencia o control respecto a los cuales se estimó la variación en la actividad de la GCs.

El estudio de la cantidad de proteínas, reveló que existía una pérdida de células del cultivo. La cuantificación de las mismas nos permitió ajustar la actividad a la cantidad de proteína en cada caso, comparando así los valores obtenidos con el control de estimulación. La tabla presenta los valores obtenidos en porcentaje de activación de la enzima respecto al control. A los valores originales se les restó la cantidad de GMPc que aparece en condiciones basales, y se corrigieron respecto a cantidad de proteína cuantificada en cada una de las condiciones. El valor control expresado en pmoles de GMPc por mg de proteína fue considerado el 100% de activación.

**Tabla IV.4. Efecto de la activación prolongada de GCs sobre su capacidad de respuesta a NO**

Tratamiento (conc.)	%Actividad	%Actividad
	24 h tto.	48 h tto.
YC-1 10 $\mu$ M	88,37 $\pm$ 18,7	72,88 $\pm$ 6,1
YC-1 50 $\mu$ M	43,8 $\pm$ 11,2	37,9 $\pm$ 5,3
YC-1 100 $\mu$ M	36,9 $\pm$ 2,4	30,5 $\pm$ 8,1

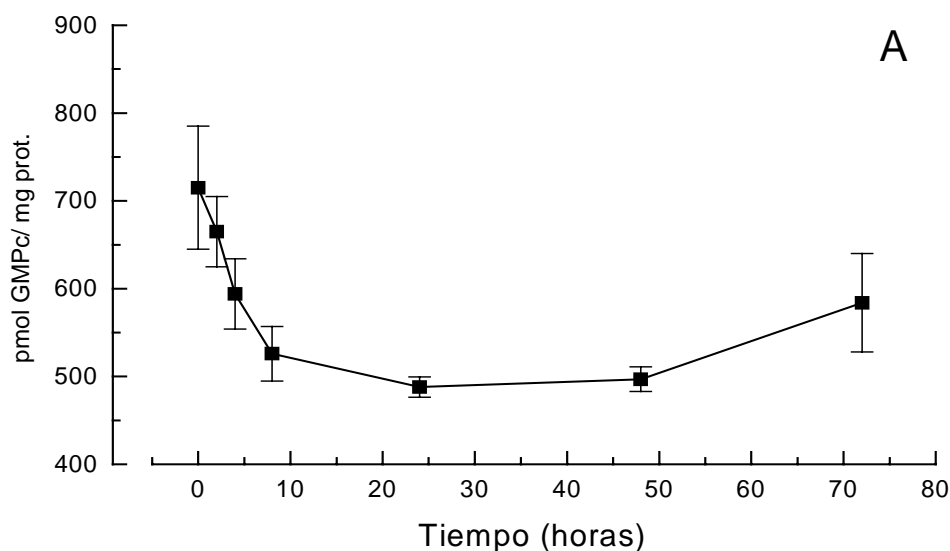
Los resultados presentados en la tabla corresponden a una media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados en triplicado a partir de distintos cultivos.

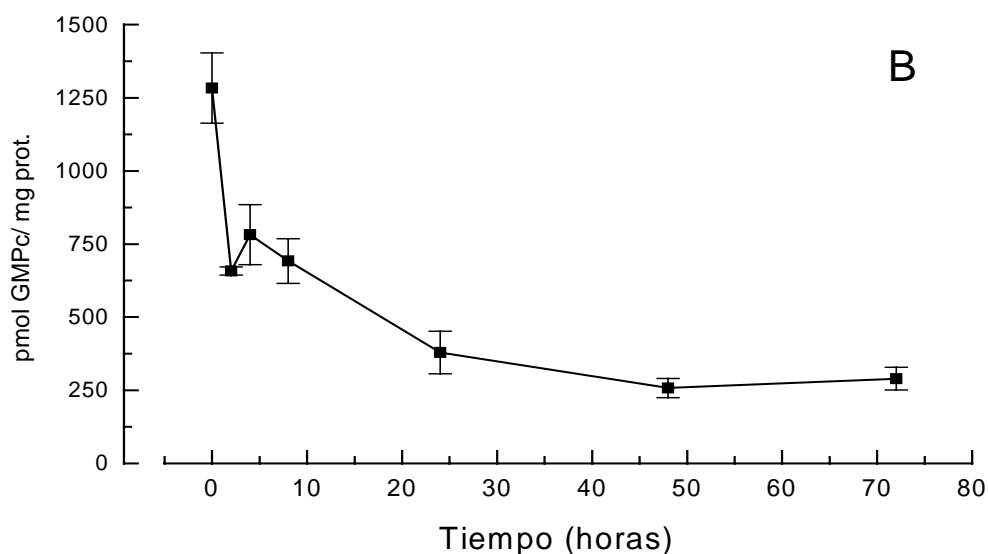
La pérdida de células descrita, causada por el tratamiento con YC-1, dió lugar a un estudio más profundo que se presenta en un capítulo posterior.

Como se ha visto, el tratamiento con agentes que activan la vía NO-GMPc durante periodos superiores a 24 horas, produce una disminución de la respuesta de GCs a NO. Con el fin de determinar cuando empieza a ser detectable este efecto, realizamos un estudio con DETA/NO 50  $\mu$ M en intervalos de tiempo de 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas. En el momento de la estimulación, se retiró el medio y se añadió Locke normal con el DEA/NO 1  $\mu$ M o bien YC-1 250  $\mu$ M durante 10 min.

La producción de GMPc en respuesta a DEA/NO disminuyó de forma muy significativa en células tratadas con DETA/NO, alcanzándose la máxima reducción en las células sometidas a tratamiento durante 24 ó 48 horas.

Los valores de activación se representan como pmol GMPc/mg prot, de forma que se corrigen las pérdidas de células que se han descrito en el caso de tratamientos con YC-1.





**Figura IV.26. Efecto de diferentes tiempos de tratamiento con DETA/NO sobre la estimulación de GCs.** La incubación se realizó con una dosis 50  $\mu$ M DETA/NO y a continuación se estimuló con DEA/NO 1  $\mu$ M (A) o YC-1 250  $\mu$ M (B) 10 min en presencia de IBMX 0,5 mM. Los valores presentados son una media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados en triplicado a partir de cultivos diferentes.

### 5.1.a. Importancia del estado reductor de la célula para la inducción de tolerancia a NO.

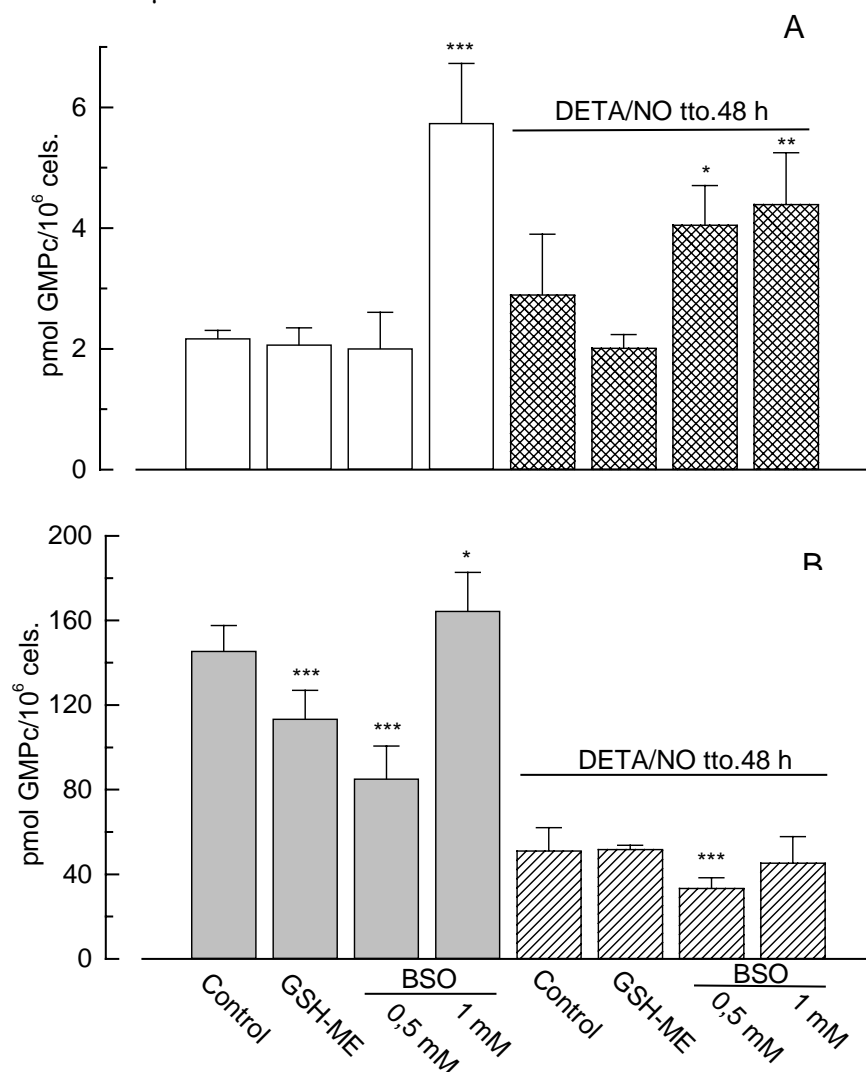
Diferentes autores han descrito la importancia que puede tener el estado reductor de las células en la interacción de determinadas moléculas de carácter oxidante, como el NO, con proteínas celulares (Dierks & Burstyn, 1998). Aparte de sus dianas específicas, el NO y sus derivados (NO<sub>x</sub>) pueden reaccionar con grupos tioles de proteínas. La nitrosilación de estos grupos en enzimas o proteínas estructurales, puede contribuir a modificar sus funciones por cambios en la estructura de los sitios catalíticos y/o alostéricos (Becker et al., 1995). Esto nos sugirió la posibilidad de que el efecto inhibitorio que aparecía en tratamientos prolongados con NO pudiera estar mediado, al menos en parte, por un cambio en la estructura de la enzima GCs que la hiciese más sensible a degradación ó modificara su actividad.

Para comprobar si, efectivamente, un cambio en el estado reductor de la célula y, por lo tanto en la capacidad de neutralizar interacciones no deseadas con proteínas, modificaba en algún sentido la regulación de la vía en los tratamientos a largo plazo con NO, introdujimos dos sustancias de efecto opuesto. Uno de ellos, el BSO, es un inhibidor de la síntesis *de novo* de glutatión reducido. Su presencia en el citosol conllevaría una disminución en la capacidad reductora de la célula. Por el contrario, el análogo permeable del glutatión, glutatión-metilester, incrementaría la cantidad de



moléculas con poder reductor en el medio intracelular, potenciando la capacidad de la célula de neutralizar interacciones no deseadas con proteínas.

El estudio se realizó introduciendo alternativamente el BSO o el glutathion-metilester en el medio de cultivo, solos o conjuntamente con DETA/NO, y observando si modificaban en algún sentido el efecto inhibitor de este último. Los tratamientos se mantuvieron durante 48 horas, tras lo cual las células se sometieron a estimulación con DEA/NO 1  $\mu$ M.



**Figura IV.27. Modificación de la respuesta a DEA/NO por el estado reductor de las células.** En el panel A se han representado los niveles de GMPc obtenidos para los distintos tratamientos indicados en presencia (barras rayadas) o ausencia (barras abiertas) de DETA/NO durante la incubación con los compuestos. En el panel B aparecen los valores de GMPc obtenidos por estimulación de las células con DEA/NO 1  $\mu$ M durante 10 min tras haber mantenido a las células con los tratamientos indicados una vez restados los valores basales de cada condición que aparecen en A. Los valores presentados son una media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados en triplicado a partir de diferentes cultivos celulares.

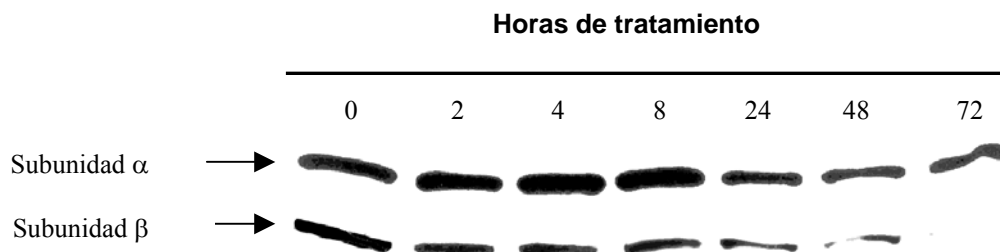
Como se observa en la figura 27, el tratamiento con GSH-ME no modificó los niveles basales de GMPc ni en células incubadas con DETA/NO durante 48 horas ni en las células control. Respecto a los niveles de GMPc obtenidos tras una nueva estimulación con NO (DETA/NO 10 min), la presencia de GSH-ME redujo parcialmente estos niveles en células control, pero no afectó al GMPc producido en las células pretratadas con DETA/NO. El hecho de que el GSH-ME disminuya la respuesta a NO en células control puede reflejar que el NO esté siendo atrapado por el GSH-ME, reacción que se ha descrito en la introducción (Mayer et al., 1998).

El tratamiento con BSO produjo un incremento sobre los niveles del GMPc medido en células no estimuladas con DEA/NO (panel A). Este incremento fue muy significativo tanto en las células control tratadas con 1mM BSO, como en las tratadas con DETA/NO 48 horas a las dos concentraciones del BSO ensayadas. Estos incrementos pueden explicarse pensando en que una menor concentración de GSH en el medio por el bloqueo de su síntesis hace que haya menor secuestro del NO por parte de éste, existiendo mayor cantidad de NO disponible para estimular la GCs. También podría deberse a la inhibición de la actividad fosfodiesterasa por parte del BSO, debido a su carácter oxidante, como ya se ha demostrado para otros compuestos de estas características (Leoncini & Signorello, 1999).

En cuanto al efecto del BSO sobre la respuesta a NO (panel B), la dosis más baja ensayada, 0,5 mM BSO, redujo de forma muy significativa los niveles de GMPc obtenidos por estimulación con NO, tanto en células control como en las tratadas 48 horas con DETA/NO. Sin embargo, este mismo compuesto añadido a una concentración de 1 mM incrementó la respuesta a NO en células control y no modificó la de células tratadas 48 horas con DETA/NO. Este efecto podría explicarse por la inhibición de la degradación del GMPc, como ya se ha comentado.

## 5.2. EXPRESIÓN DE LA ENZIMA GCs

Como ya se ha demostrado en capítulos anteriores, la elevación de los niveles de GMPc da lugar a una desensibilización de la ruta, y este efecto se produce por una modificación en el estado de fosforilación de la GCs a tiempos cortos. Sin embargo, en tratamientos más prolongados sería posible que disminuyera la cantidad de la enzima, y que este hecho fuera el responsable de los cambios tan importantes observados en la actividad de la GCs.

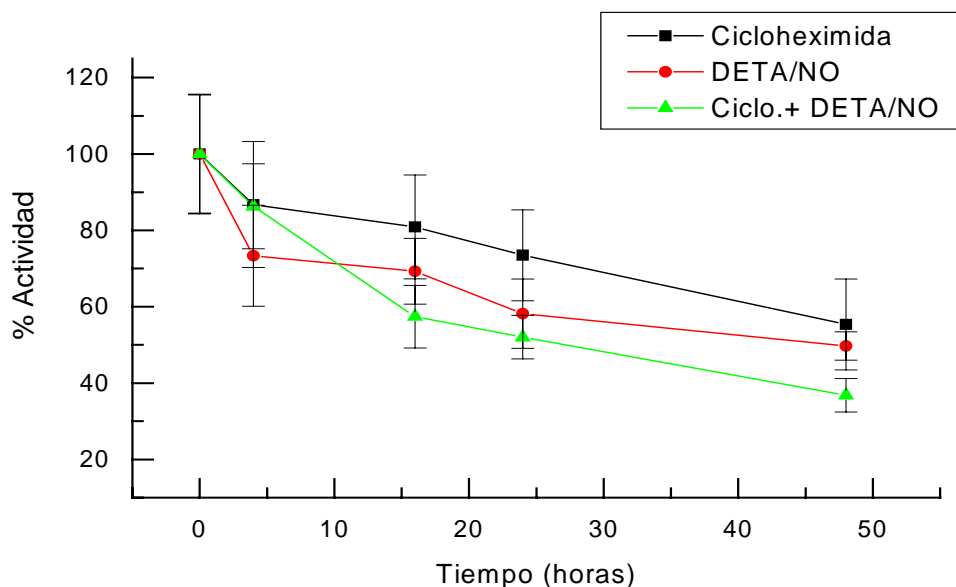


**Figura IV.29. Inmunodetección de la GCs.** Las células se trataron con DETA/NO 50  $\mu$ M durante los tiempos indicados (horas). A continuación se hizo una detección con anti-GCs. La fotografía corresponde a un experimento representativo.

El análisis de los niveles de las dos subunidades de la enzima ( $\alpha$  y  $\beta$ ) mediante inmunotransferencia, reveló que la disminución de la actividad estaba acompañada por una reducción de los niveles de enzima. Aunque se observan cambios en las dos subunidades, la reducción más importante se aprecia en la subunidad  $\beta$ .

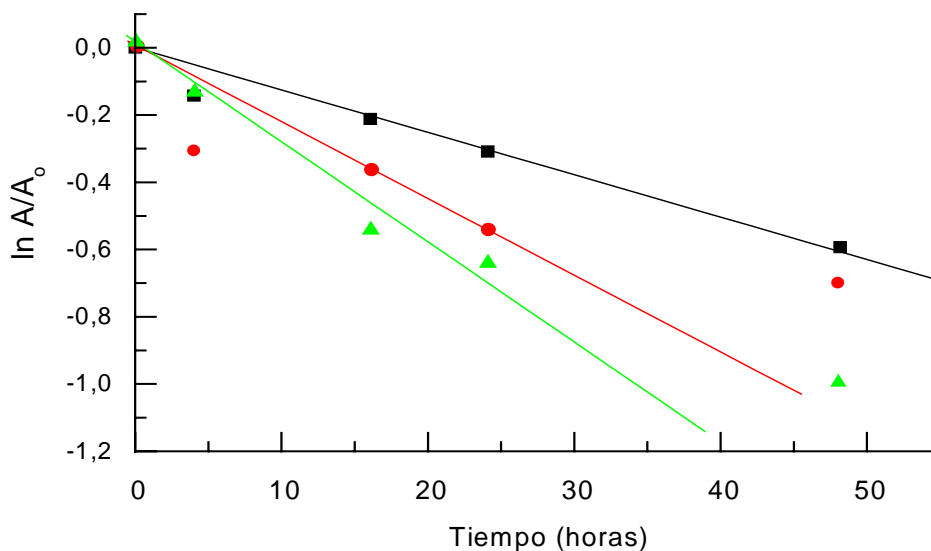
### 5.2.a. Vida media de la enzima GCs

La concentración de una proteína en una célula es el resultado del equilibrio existente entre la velocidad de síntesis y de degradación de la misma. El efecto observado sobre los niveles de GCs cuando las células se someten a un tratamiento prolongado con DETA/NO, podría deberse a una inhibición de la síntesis de la proteína, o bien a un aumento en la velocidad de degradación de la misma. Se llevaron a cabo experimentos incubando durante distintos tiempos las células con un inhibidor de la síntesis proteica, la cicloheximida, con DETA/NO y con ambos compuestos juntos. Posteriormente las células se estimularon con DEA/NO y se cuantificó el GMPc.



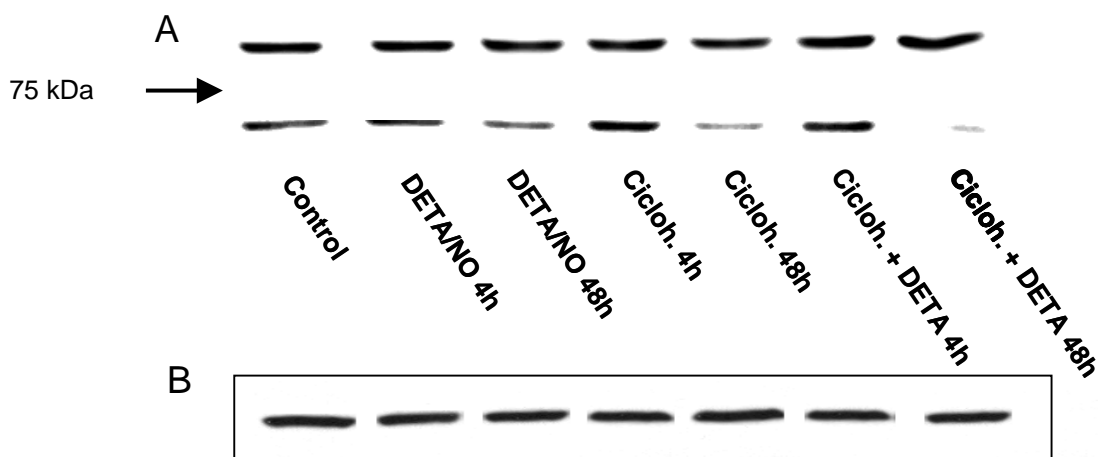
**Figura IV.29. Modificación de la respuesta a NO.** Tras la incubación con cicloheximida 10  $\mu\text{g/mL}$  ó DETA/NO 50  $\mu\text{M}$  ó ambos compuestos simultáneamente durante los tiempos indicados, se estimularon con DEA/NO 1  $\mu\text{M}$  10 min y se midió el GMPc producido por las células en cada una de las condiciones. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E. de dos experimentos realizados en triplicado a partir de cultivos distintos.

El ajuste lineal de los valores representados en la figura nos permitió calcular la vida media de la proteína para cada uno de los tratamientos, de manera que podemos comparar el efecto de cada uno de ellos sobre la actividad GCs. El tratamiento con CHX reveló que la vida media para la actividad de GCs era de  $55 \pm 3,6$  horas, superior a la obtenida cuando las células se incubaron con DETA/NO  $30,6 \pm 0,1$  horas (Fig 30). Realizando los mismos experimentos en presencia de ambos compuestos, cicloheximida y DETA/NO, la vida media fue de  $23,36 \pm 1,6$  horas.



**Figura IV.30. Representación semilogarítmica de la actividad en función del tiempo.** Se ha representado el  $\ln$  del cociente de la actividad obtenida a cada tiempo respecto a la actividad inicial en función del tiempo según la ecuación  $\ln A/A_0 = -K \cdot t$ . La pendiente nos permite calcular el valor de  $k$  y el valor de la vida media de la enzima en cada una de las condiciones ( $t_{1/2} = \ln 2/K$ ).

Estos resultados indican que, aunque el NO podría afectar a la velocidad de síntesis de la GCs, el hecho de que en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas el DETA/NO disminuya la vida media de la actividad, indica que también estaría modificando bien a la actividad de la enzima propiamente dicha ó a la velocidad de degradación de la proteína



**Figura IV. 31. Detección por inmunotransferencia de las subunidades de GCs.** El panel A muestra los resultados de la detección con el anticuerpo anti-GCs, donde podemos diferenciar las dos subunidades de la enzima. La fotografía presenta un experimento representativo de tres realizados en las condiciones indicadas. Se diferencian las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima. En el panel B se muestra el control de carga realizado con anti- $\alpha$  actina.

En la figura 31 se observa que tanto el tratamiento con DETA/NO como con cicloheximida redujeron significativamente el nivel de la subunidad  $\beta$  de la GCs, atribuyendo las disminuciones observadas en la actividad a una menor cantidad de enzima activa. Esta reducción fue aún mayor en presencia de las dos drogas juntas. Estos resultados podrían indicar que el NO disminuye la estabilidad de la subunidad  $\beta$ , provocando una degradación de la misma.

La velocidad de síntesis de una proteína depende de la cantidad de ARNm que codifica para dicha proteína y del proceso de síntesis propiamente dicho. Por ello también se han realizado experimentos para analizar si el tratamiento con NO afecta a los niveles de los RNAm que codifican para las dos subunidades de la GCs ( $\alpha_1$  y  $\beta_1$ ). Mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa, observamos que el tratamiento con DETA/NO durante 16 ó 24 horas producía una reducción muy significativa de los niveles de los RNAm que codifican para las dos subunidades.

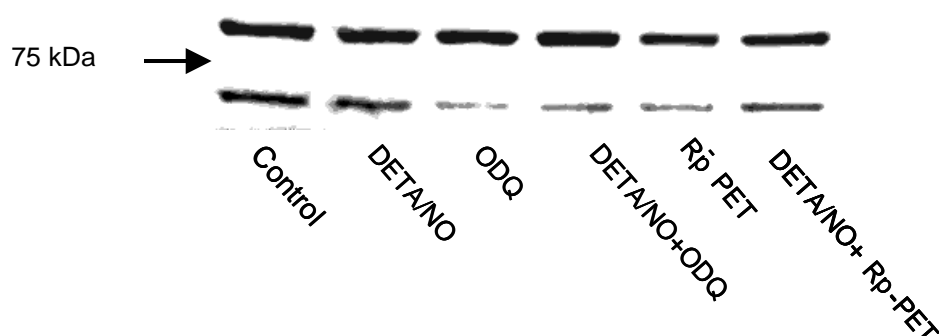
Como control endógeno se ha utilizado el ácido ribonucleico ribosomal 18s. El tratamiento con DETA/NO no modifica los niveles de expresión de éste ácido ribonucleico. Además nos sirve para corregir posibles diferencias en la eficiencia de la reacción de transcripción inversa.

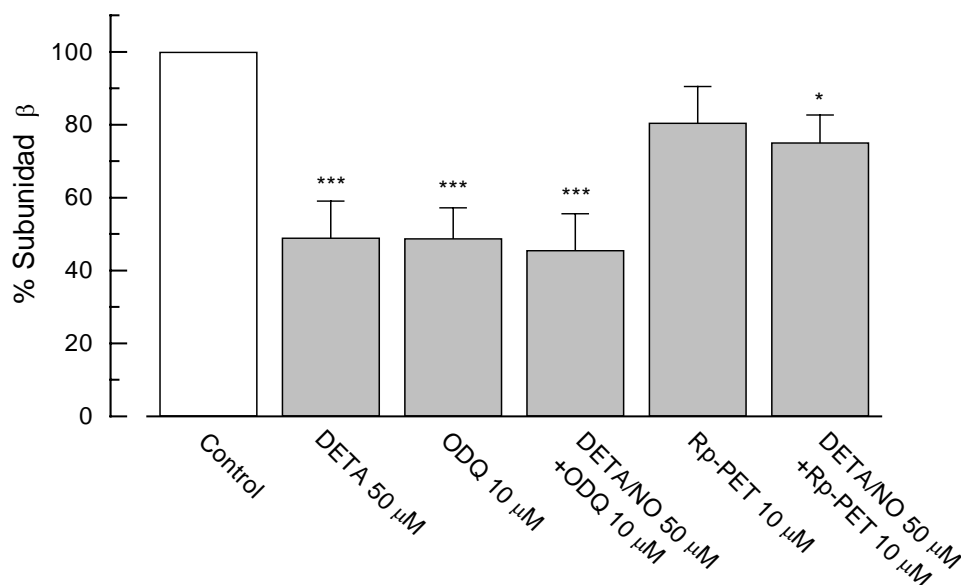
Los resultados obtenidos cuando se analizan los ARNm contrastan con los obtenidos cuando se analizan los niveles de proteína de las dos subunidades. Mientras que los ARNm de las dos subunidades se reducen en la misma proporción, solamente se observa una variación en los niveles de la cadena proteica correspondiente a la subunidad  $\beta$ .

### 5.2.b. Mecanismo de regulación de la expresión

Se han realizado diferentes estudios encaminados a dilucidar el mecanismo molecular implicado en la reducción de la actividad y de los niveles de las subunidades de la proteína GCs por tratamientos prolongados con NO. Los efectos del NO pueden producirse por un mecanismo dependiente ó independiente de la producción de GMPc.

Para llegar a comprender dicho mecanismo, se realizaron experimentos combinando la presencia del donador de NO, DETA/NO, que como ya se ha descrito produce una disminución tanto de la actividad como de la expresión de la GCs, con compuestos que bloquean los elementos de la vía.



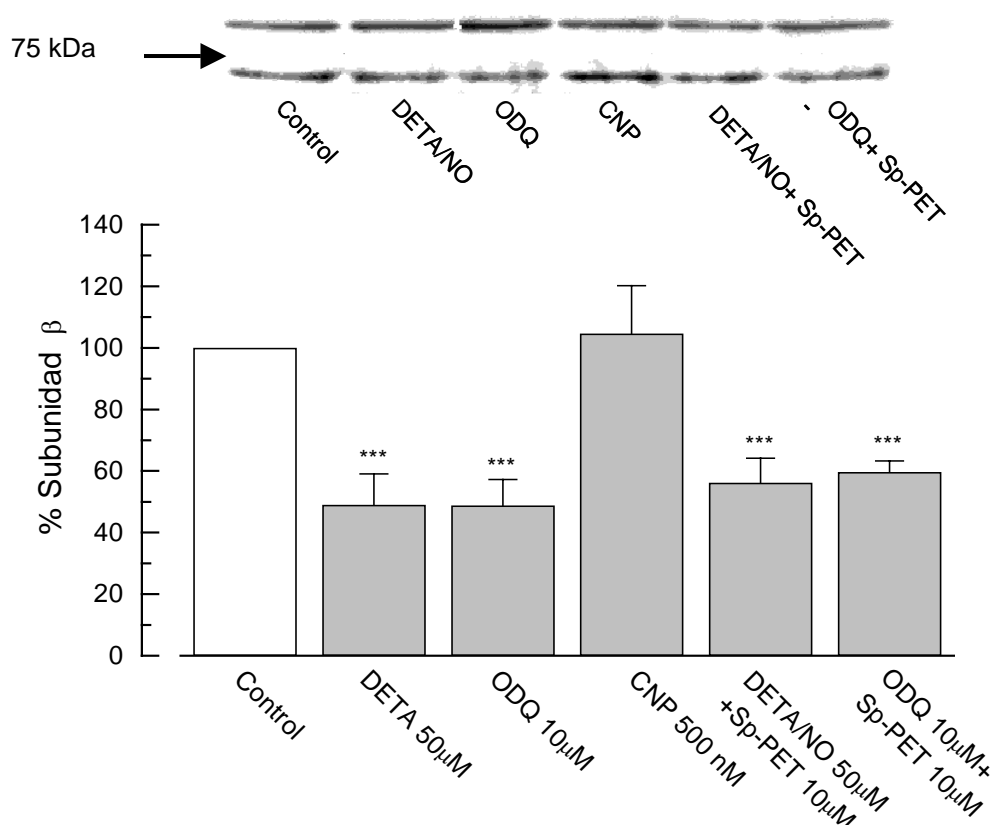


**Figura IV.32. Modulación de la expresión de la subunidad β de la GCs.** Los extractos solubles de las células sometidas a tratamientos con DETA/NO 50 μM, ODQ 10 μM ó Rp-PET 10 μM durante 48 horas se analizaron por inmunotransferencia y los resultados de la cuantificación densitométrica se presentan como una media ± S.E. de al menos 5 experimentos realizados con distintos cultivos. En la fotografía se muestra un experimento representativo del análisis por inmunotransferencia de las células sometidas a los tratamientos indicados donde se diferencian las subunidades α y β de la enzima.

Los compuestos inhibidores bien de la GCs, el ODQ, o bien de la PKG, el Rp-8-Br-PET-cGMP, se añadieron al medio una hora antes de introducir el donador de NO, de manera que la ruta estuviera bloqueada y no pudiera responder al NO. Como se aprecia en la figura 32, la expresión de la subunidad β de la GCs disminuye en un 50% cuando las células se someten a un tratamiento de 48 horas con DETA/NO. Este efecto de regulación negativa de la expresión de la enzima, no se previene por inhibición de la misma con ODQ. Por el contrario este tratamiento causó por sí mismo una caída en los niveles de la enzima. El tratamiento con el inhibidor de PKG previno la disminución causada por el tratamiento con DETA/NO sin modificar él mismo los niveles de GCs.

Se analizó el efecto de un activador de la PKG conjuntamente con los dos tratamientos que habían demostrado tener un mayor efecto de regulación negativa sobre los niveles de la enzima, el DETA/NO y el ODQ (figura 33). El tratamiento simultaneo con el Sp-8-Br-PET-cGMP y el donador de NO produjo la misma reducción sobre la expresión de la subunidad □ de la enzima que el DETA/NO por sí mismo. Lo mismo ocurrió con el ODQ. De la misma forma, se realizó un tratamiento con CNP con el objeto de determinar si la activación de la vía mediante el incremento de los niveles de GMPc era suficiente para modificar los niveles de GCs.

Sin embargo, el CNP no demostró tener un efecto significativo sobre la cantidad de enzima.



**Figura IV.33. Modulación de la expresión de la subunidad  $\beta$  de la GCs.**

Los extractos solubles de las células sometidas a tratamientos con DETA/NO 50  $\mu$ M, ODQ 10  $\mu$ M, CNP 500 nM Sp-PET 10  $\mu$ M durante 48 horas se analizaron por inmunotransferencia y los resultados de la cuantificación densitométrica se presentan como una media  $\pm$  S.E. de al menos 4 experimentos realizados con distintos cultivos. En la fotografía se muestra un experimento representativo del análisis por inmunotransferencia de las células sometidas a los tratamientos indicados donde se diferencian las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima.

Estos resultados indican que el efecto de regulación de la expresión de la enzima GCs causada por el NO está mediado, al menos en parte, por la activación de la PKG.

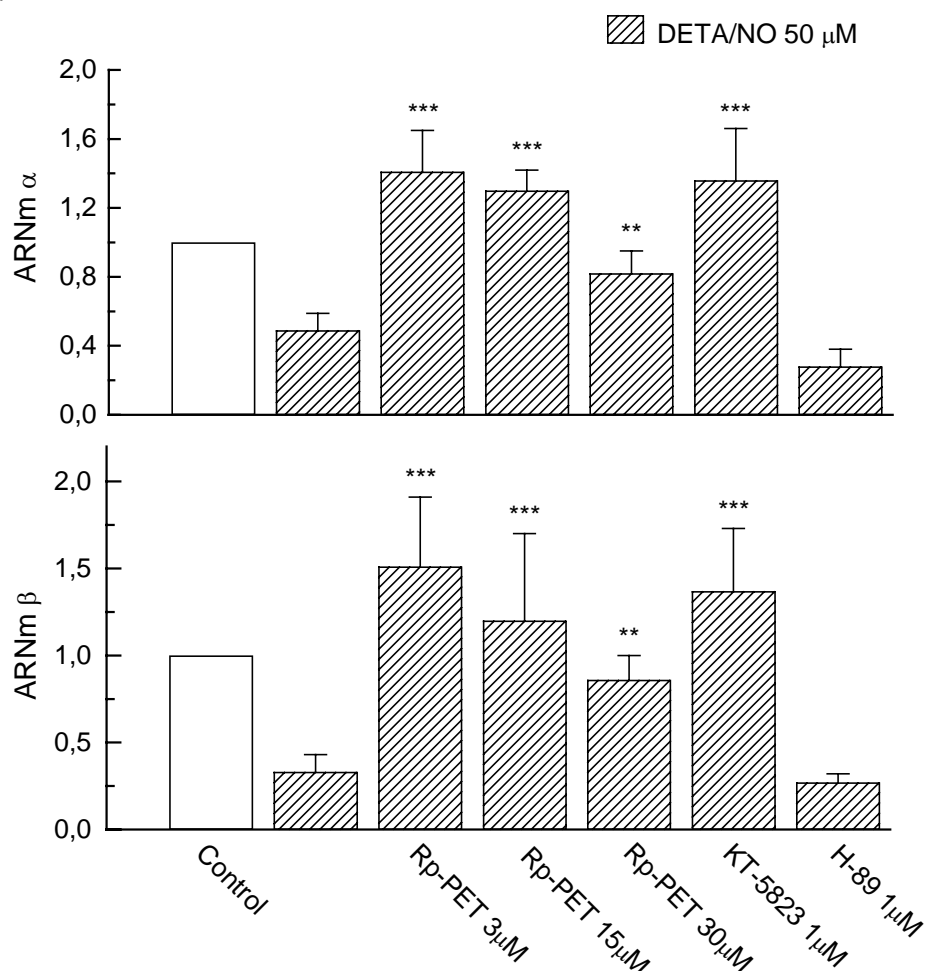
### 5.2.c. ARNm de la GCs

Dado que la síntesis de una proteína depende de la cantidad de ARNm disponible que codifica para ella, estudiamos si el tratamiento con NO, que provoca una caída de la actividad GCs y de los niveles de proteína (subunidad  $\beta$ ), también modifica los niveles de mensajero para ésta.

Como vemos en la figura 34, el tratamiento de las células durante 16 horas con DETA/NO, reduce en un 50% la cantidad de ARNm para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs.

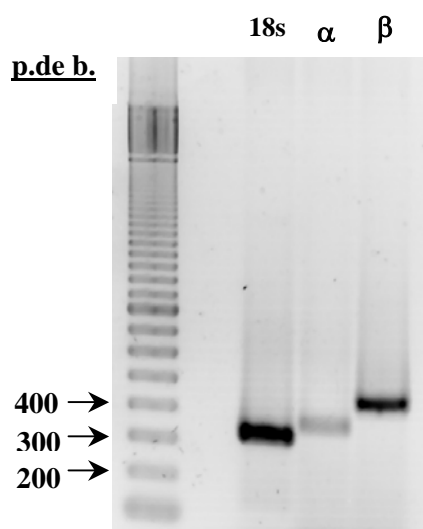
Puesto que el DETA/NO incrementa los niveles de GMPc y éste a su vez activa a la PKG, en primer lugar se analizó si la PKG estaba implicada en el mecanismo. Las células se incubaron con Rp-8-Br-PET-cGMP una hora antes de la adición del DETA/NO y posteriormente se analizaron los niveles de ARNm de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ . Según se muestra en la figura la presencia de este inhibidor previno completamente el efecto del DETA/NO, indicando que la actividad de PKG participa en el mecanismo de control de la expresión de las dos subunidades de la GCs. Esta hipótesis se confirmó realizando experimentos con otro inhibidor de la PKG, el KT-5823, que también previno el efecto del DETA/NO.

Experimentos en los que se introdujo el inhibidor de PKA, H-89, revelaron que éste tratamiento no prevenía el efecto del DETA/NO, sino que los niveles de mensajero disminuyeron aún más que con el NO solo. Este hecho revela que la PKA podría estar implicada en el mantenimiento de los niveles de ARNm para las subunidades de GCs.



**Figura II.34. Cuantificación del ARNm de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs.** Análisis por PCR cuantitativa del ARNm de las subunidades. Las células fueron sometidas a 16 horas de tratamiento con los agentes que se detalla en la figura y a continuación se extrajo el ARNm para su cuantificación. Las barras blancas representan la cantidad presente en células no tratadas. Los datos representados son la media  $\pm$  S.E. de tres experimentos realizados por duplicado con distintos cultivos. La significación estadística indicada se ha calculado respecto al tratamiento con DETA/NO solo. El valor de ese tratamiento presentó una diferencia muy significativa respecto al control ( $p < 0,001$ ).





**Figura 35. Fragmentos amplificados por PCR.** Gel en el que se han corrido los productos amplificados en un experimento de PCR cuantitativa. Las bandas corresponden a los fragmentos amplificados con los primers para las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y 18 s.

## 6. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A YC-1

Dado que se ha descrito que el YC-1 es un activador directo de la enzima GCs, planteamos experimentos para determinar cual era el efecto del tratamiento durante periodos prolongados de tiempo con este compuesto.

En experimentos realizados anteriormente y ya descritos, comprobamos que, en nuestros modelos celulares, el YC-1 era capaz de incrementar de manera efectiva los niveles de GMPc. Además, este efecto era prevenido por tratamiento con el inhibidor de GCs, ODQ a una concentración 10  $\mu$ M.

Los datos expuestos en el capítulo anterior muestran que, efectivamente, el tratamiento con YC-1 a 24 y 48 horas tiene un efecto regulador sobre la capacidad de activación de la GCs. Este efecto muestra ser dependiente de concentración y del tiempo de estimulación. Sin embargo, como se ha descrito en el capítulo anterior, cuando las células se mantenían en presencia de YC-1 durante los periodos descritos para la regulación de la enzima, se apreció un pérdida de células en la superficie de cultivo. Esto nos llevó a realizar un estudio más detallado del efecto de este compuesto sobre las células.

### 6.1. Efecto sobre la estructura y la capacidad de adhesión celular

Al observar al microscopio los cultivos primarios de células cromafines sometidos a los tratamientos con YC-1, nos llamó la atención que el aspecto de las células había cambiado. Estas células en cultivo presentan una morfología característica redondeada, pero extendida de forma que quedan adheridas a la superficie de cultivo. Sin embargo, los tratamientos con distintas concentraciones de YC-1, durante 24 o 48 horas, modificó su apariencia. Las células se volvieron redondeadas y menos aplastadas, desprendiéndose fácilmente de la superficie de cultivo.

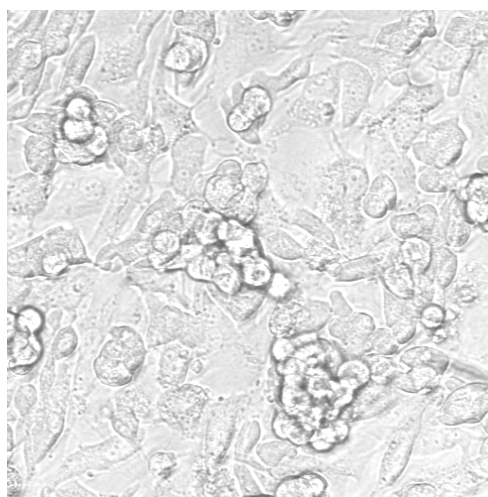
Si bien el efecto sobre las células cromafines era llamativo, los cambios acaecidos en las pocas células endoteliales que contaminaban el cultivo fueron aún más evidentes. Aunque en general estas células no representan más de un 5% del total de células en

el cultivo primario, las pocas que se encuentran, tienen una morfología muy distinta de las cromafines, y por lo tanto es muy fácil localizarlas simplemente por observación del cultivo al microscopio. Estas células son fusiformes, y mucho más planas que las células cromafines. En cultivos de endoteliales puras, éstas tienden a disponerse en paralelo, formando una estructura de aspecto tisular. Las células endoteliales que fueron sometidas junto a las cromafines a un tratamiento con YC-1, perdieron todas las características descritas. Por una parte, el aspecto de las células aparecía redondeado, y se perdió su capacidad de adhesión al plástico de cultivo.

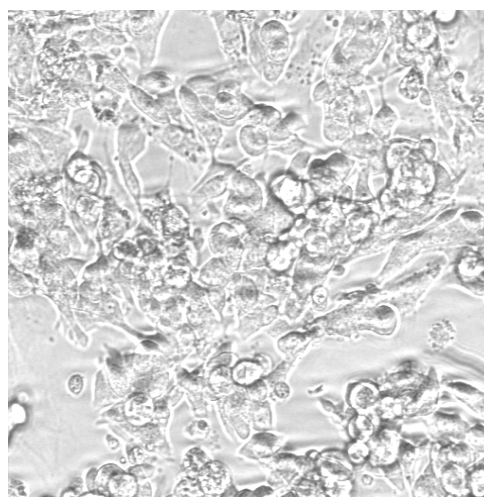
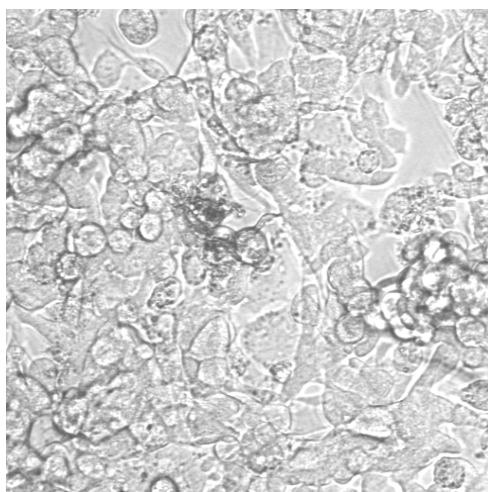
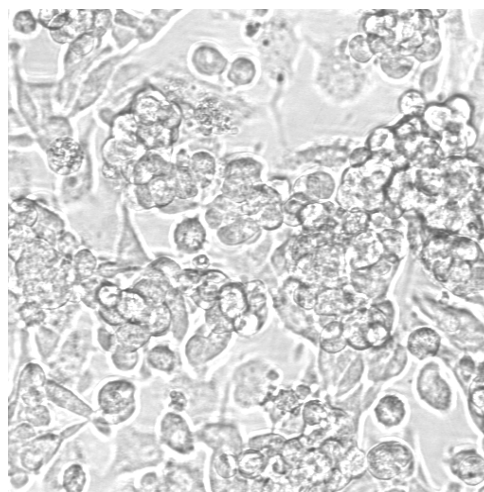
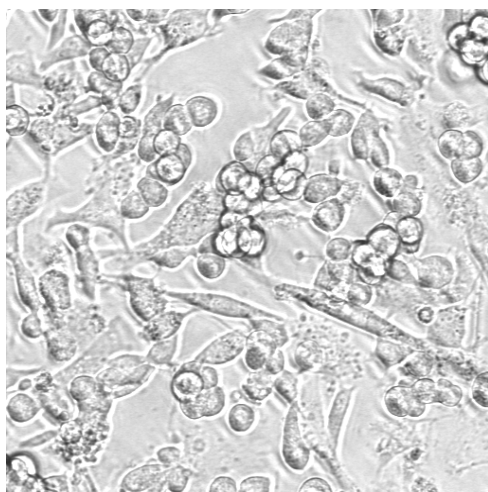
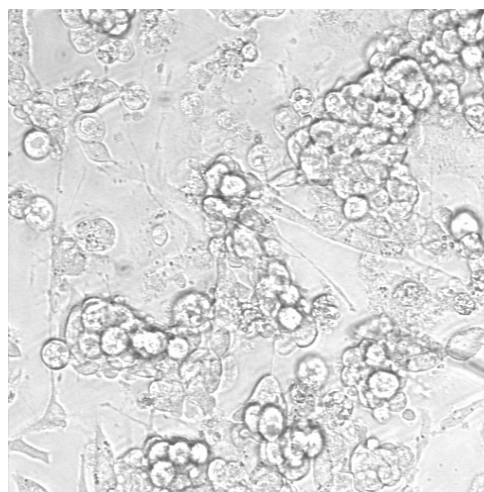
La importancia de las células endoteliales radica en que forman parte de los vasos sanguíneos. Este hecho hizo que nos pareciera de gran relevancia estudiar el efecto que el YC-1 pudiera ejercer sobre la integridad de este tipo celular. Por ello aislamos y mantuvimos cultivos de endoteliales en los cuales se ensayaron los tratamientos con YC-1, haciéndose un estudio de diferentes parámetros de viabilidad y funcionalidad, en los dos tipos de células.

En primer lugar se llevaron a cabo estudios morfológicos más exhaustivos de ambos tipos celulares. Cultivos prácticamente puros en cromafines, así como células endoteliales confluentes de segundo pase, se sometieron a tratamientos con YC-1 a dosis crecientes y durante tiempos que fueron desde 8 a 72 horas. En la figura 36 se muestran micrografías de contraste de ambos cultivos tras 24 horas de incubación. Los efectos sobre el aspecto morfológico celular fueron evidentes a las 16 horas de tratamiento, y tras 72 horas de incubación se había perdido la adhesión de la mayoría de las células. A concentraciones tan bajas como 5  $\mu\text{M}$  el cambio en la morfología era evidente, sobre todo en células endoteliales (fig 37).

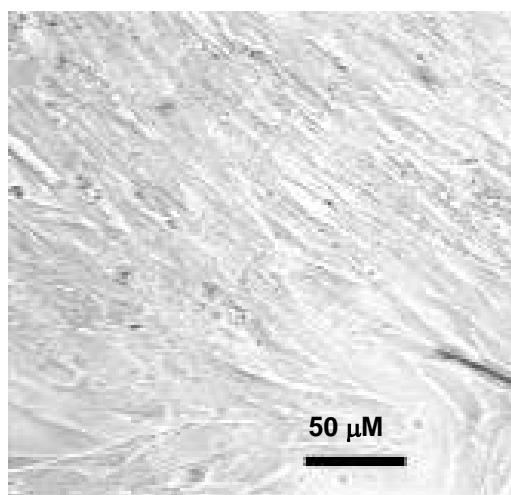
Con el propósito de establecer si este efecto estaba relacionado con la capacidad del YC-1 de activar la GCs, se introdujo en los cultivos el inhibidor de ésta enzima, ODQ 10  $\mu\text{M}$ . Esta concentración inhibía eficazmente la capacidad del YC-1 de incrementar los niveles de GMPc, tanto en células cromafines como endoteliales. Sin embargo, como se observa en la figura, este compuesto no evitó los cambios observados en la morfología de ambos cultivos celulares. Además, dado que los niveles de activación de la GCs que se alcanzan en células endoteliales son mucho menores que en las cromafines a las mismas dosis, la activación de la vía no explicaría que, en las primeras, los efectos fueran aún mas marcados que en estas últimas. Por otro lado, los experimentos descritos en el capítulo anterior realizando estimulaciones también muy prolongadas con NO, habrían originado alguna de estas modificaciones en el caso de deberse a activación de la vía, mientras que no se apreciaron en ninguno de los casos.



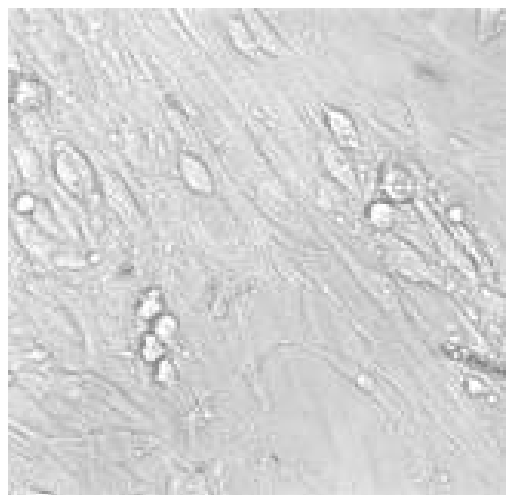
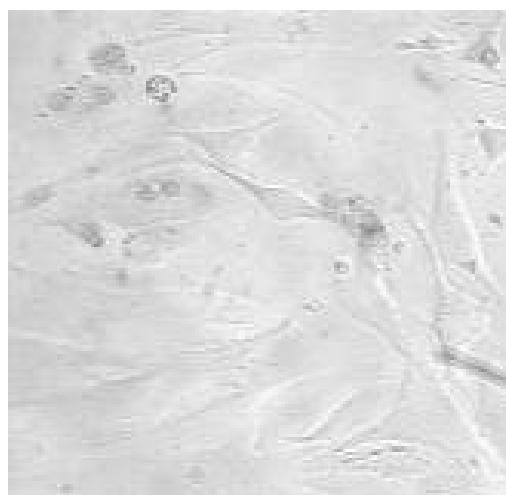
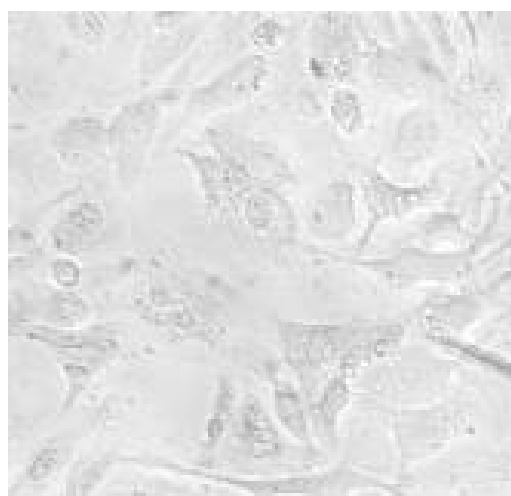
Control

YC-1 5  $\mu$ MYC-1 10  $\mu$ MYC-1 25  $\mu$ MYC-1 50  $\mu$ MYC-1 100  $\mu$ M

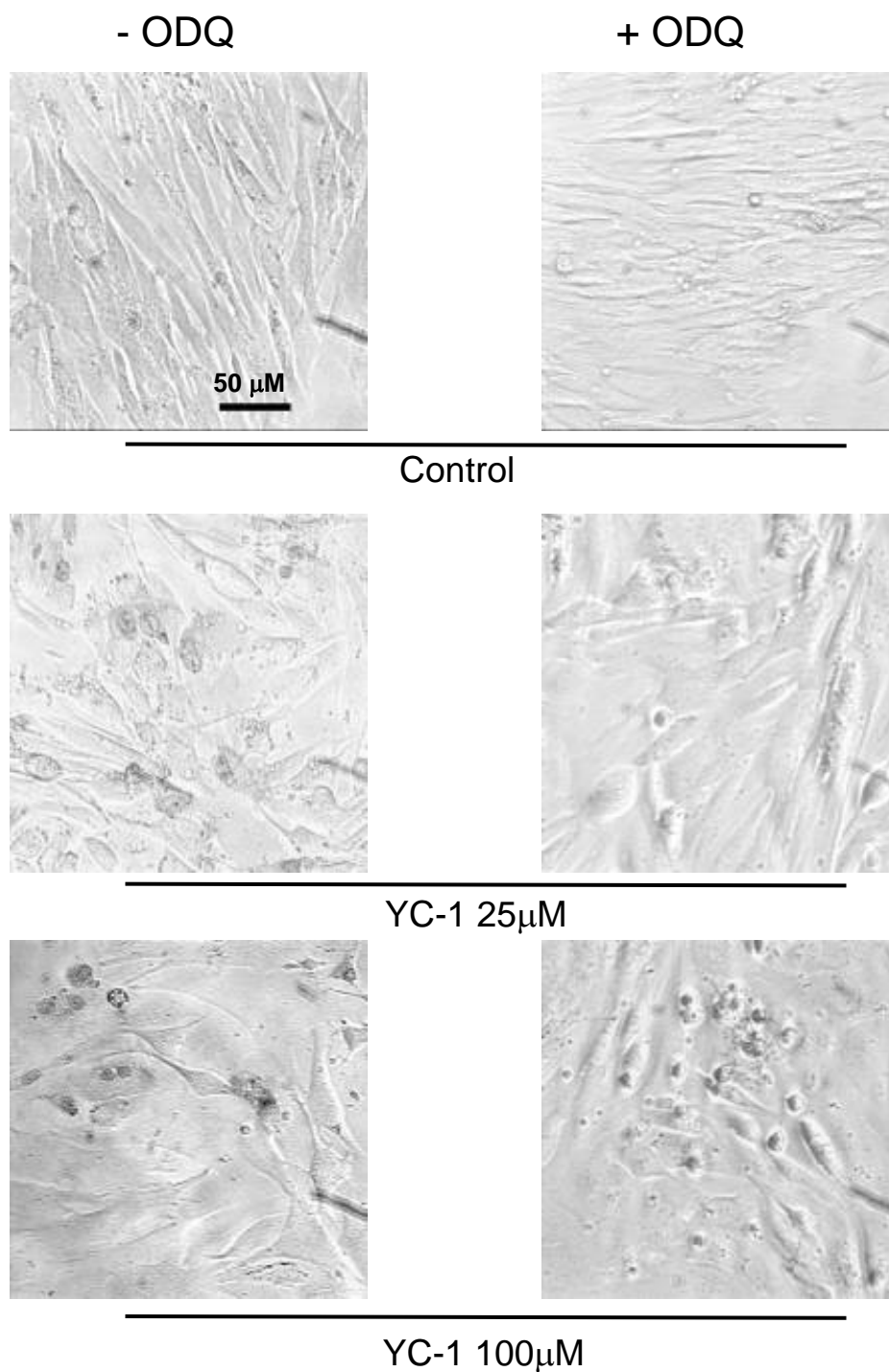
**Figura IV.36. Tratamiento de células cromafines con YC-1.** Incubación de cultivos de células cromafines durante 24 horas con concentraciones crecientes de YC-1. Las fotografías son representativas de 3 experimentos realizados con distintas preparaciones celulares.



Control

YC-1 5 $\mu\text{M}$ YC-1 25 $\mu\text{M}$ YC-1 50 $\mu\text{M}$ YC-1 100 $\mu\text{M}$ 

**Figura IV.37. Tratamiento de células endoteliales con YC-1.** Incubación de cultivos de células endoteliales durante 24 horas con concentraciones crecientes de YC-1. Las fotografías son representativas de 3 experimentos realizados con distintas preparaciones celulares.



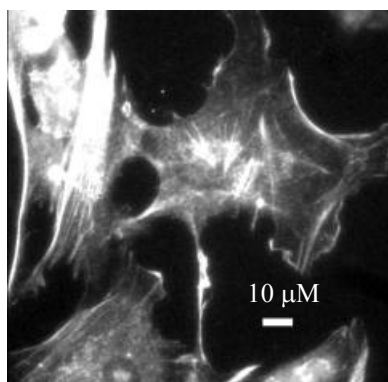
**Figura IV. 38. Tratamiento con YC-1 en presencia de ODQ.** Las células endoteliales se incubaron con distintas concentraciones de YC-1 durante 24 horas en presencia (dcha.) o ausencia de ODQ (izqda). Las fotografías son representativas de 3 experimentos realizados con distintas preparaciones celulares.

## 6.2. Estudio del citoesqueleto celular

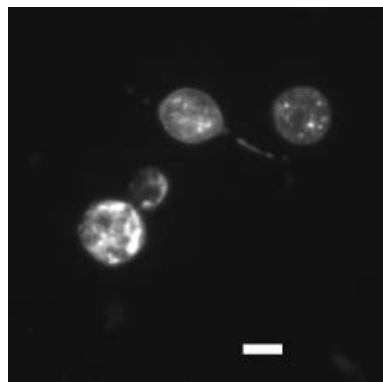
Es evidente que el mantenimiento de la morfología celular requiere a su vez la presencia de un citoesqueleto intacto. El citoesqueleto celular está formado por actina, tubulina y proteínas filamentosas intermedias. Por ello, para comprobar si los efectos que habíamos observado sobre la morfología celular eran debidos a una desorganización del citoesqueleto, realizamos un estudio de los filamentos de actina.

Para estudiar la organización de los filamentos de actina, llevamos a cabo experimentos de inmunohistoquímica marcando las células con anticuerpos anti- $\alpha$ -actina. Así observamos que los cambios morfológicos, tanto en el caso de las cromafines como en el de las células endoteliales, eran debidos a que se había perdido la estructura organizada de filamentos de actina. Los filamentos, no sólo eran irreconocibles como tales, si no que además aparecieron condensaciones de los monómeros de  $\alpha$ -actina (figuras 39 y 40).

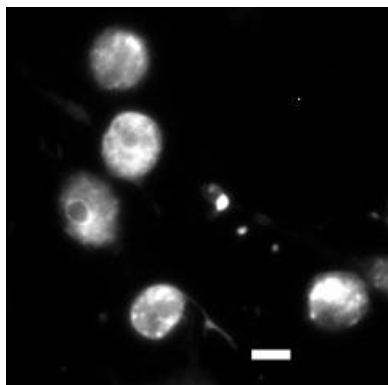
La incubación simultanea con ODQ, con el objetivo que ya se ha descrito de determinar si el efecto estaba mediado directamente por la activación de la GCs, no fue capaz, una vez más, de prevenir esta desorganización en ninguno de los dos tipos celulares.



Control



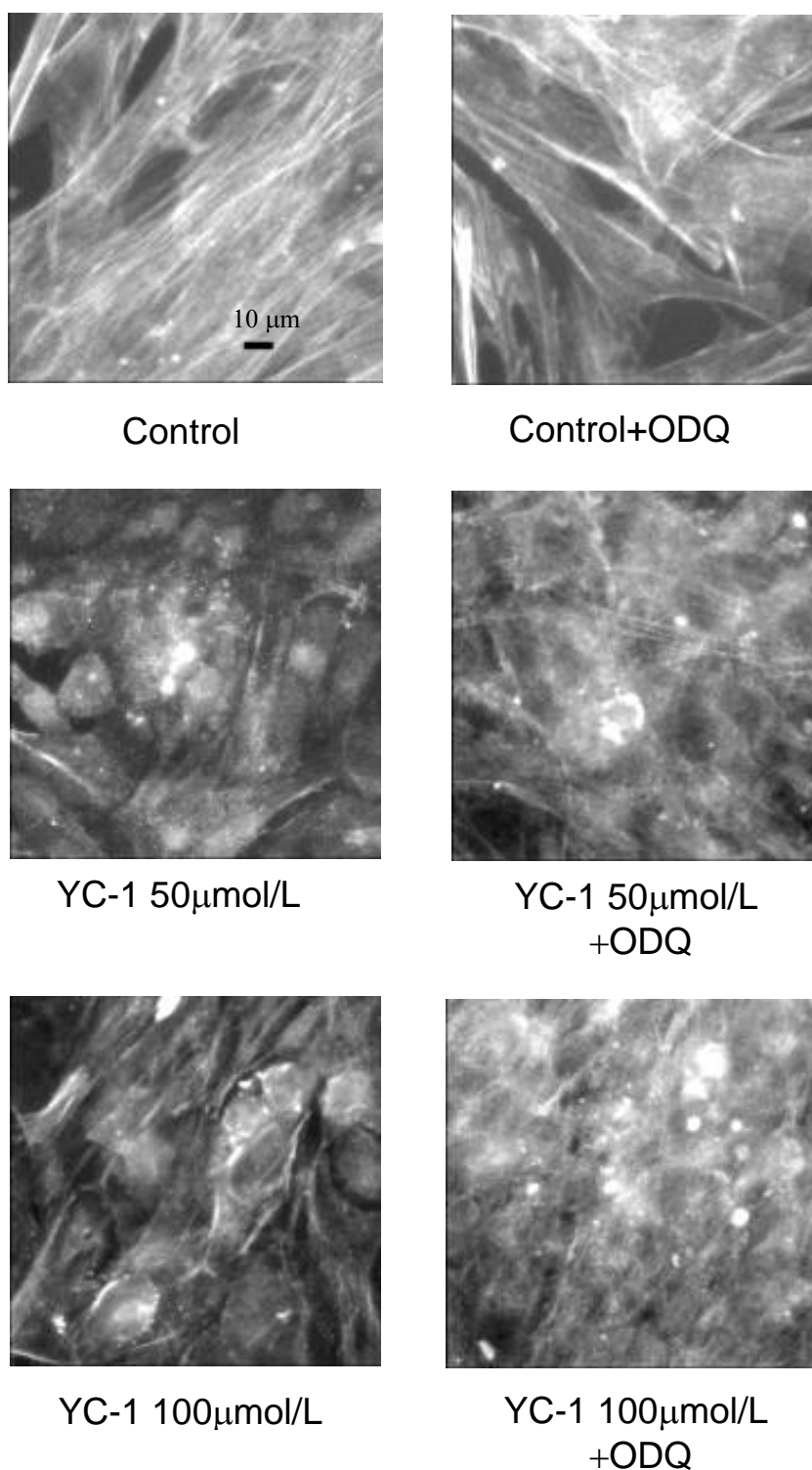
YC-1 50  $\mu$ M



YC-1 50  $\mu$ M + ODQ

**Figura IV.39. Efecto del YC-1 sobre la organización de los filamentos de actina en células cromafines.** Las células se incubaron con YC-1 50  $\mu$ M durante 24 horas en ausencia y presencia de ODQ 10 $\mu$ M, y se realizó el ensayo de inmunohistoquímica como se describe en métodos. Las fotografías son representativas de 3 experimentos realizados con distintas preparaciones celulares.





**Figura IV.40. Marcaje del citoesqueleto de células endoteliales.** Las células endoteliales confluentes se incubaron con el tratamiento correspondiente durante 24 horas. Se marcaron con anti- $\alpha$  actina. Las fotografías son representativas de 3 experimentos realizados con distintas preparaciones celulares.

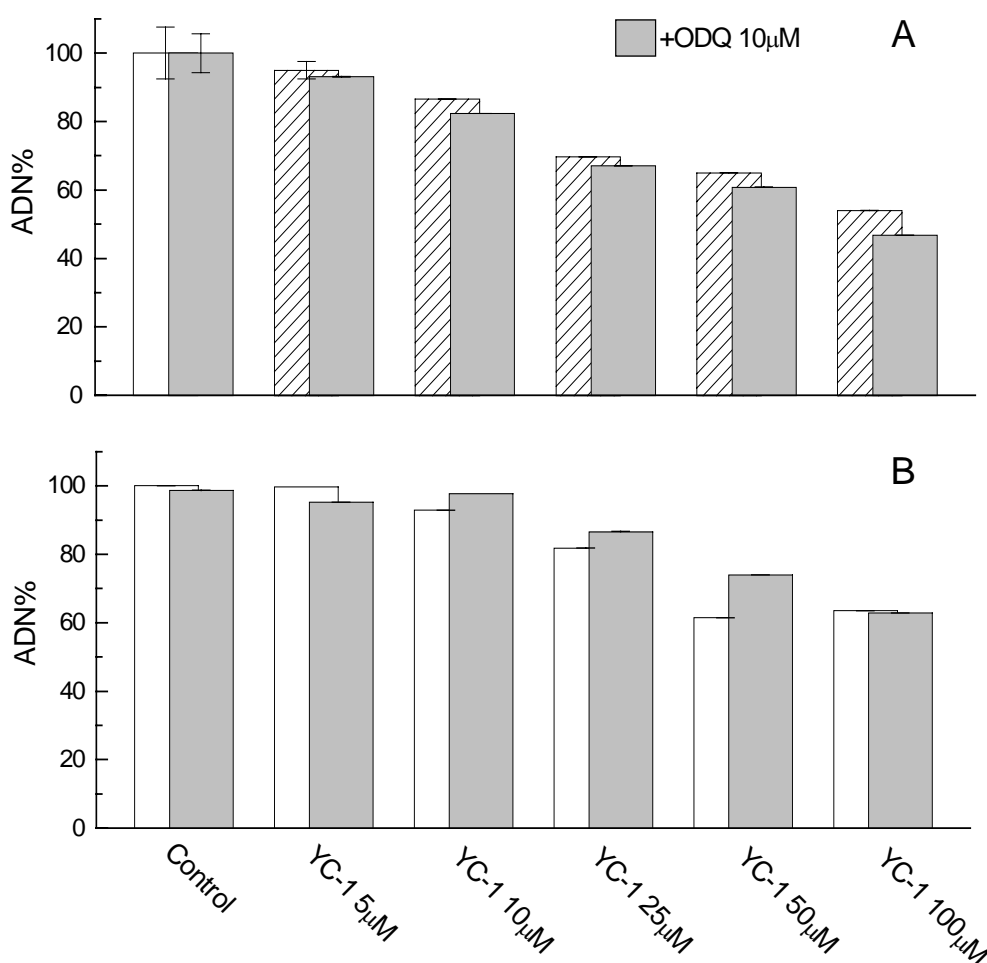




### 6.3. Estudio de la densidad celular de los cultivos

Las células endoteliales se distinguen en cultivo por su capacidad de dividirse incrementando su número. Una vez que las células han alcanzado confluencia en la superficie de cultivo, permanecen en estado de reposo, esto es, en fase G<sub>0</sub>. Las diferencias entre las células en estado proliferativo o quiescente pueden determinar que unos tratamientos influyan sobre ellas o no.

Por este motivo se evaluó el efecto que el YC-1 ejercía sobre las células endoteliales, tanto en estado proliferativo, como una vez alcanza la confluencia. Se trataba de precisar si el efecto sobre la morfología celular y el citoesqueleto se manifestaba cualquiera que fuera el estado en que se hayaran las células en el momento de la estimulación con YC-1.

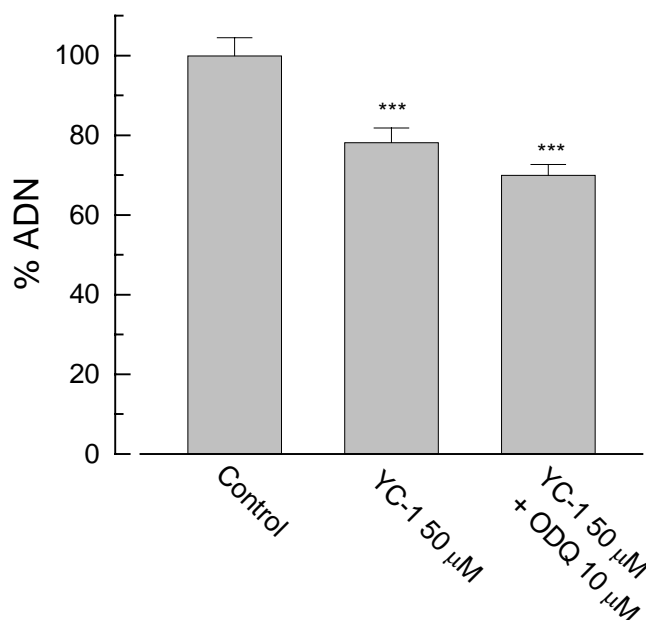


**Figura IV.41. Cuantificación del DNA de células endoteliales.** Las células endoteliales en estado preconfluyente (A) y en estado confluyente (B), se trataron con concentraciones crecientes de YC-1 durante 24 h en ausencia (barras ralladas) o presencia (barras grises) de ODQ 10 µM. El valor 100 se corresponde con 3502 y 3802 ng ADN/pocillo en células cromafines y endoteliales respectivamente. Los resultados representados son la media de dos experimentos realizados en triplicado  $\pm$  S.E.

Sometimos los cultivos en ambos estados proliferativos a tratamientos con diferentes concentraciones de YC-1. A continuación se cuantificó el DNA extraído de ellos, comparando las cantidades determinadas para los diferentes tratamientos con controles a los que no se sometió a ningún agente. Además se llevaron en paralelo tratamientos que incluían YC-1 y ODQ para estudiar si el efecto era dependiente del incremento en los niveles de GMPc.

En la figura 41 se muestra como la disminución en los niveles de ácidos nucleicos obtenidos, disminuía en mayor proporción cuando se trató de células en estado proliferativo o preconfluyente. Además, en ninguno de los casos la inhibición de la enzima GCs fue capaz de prevenir estos efectos.

Se puede apreciar en la figura 42 como tras 24 horas de tratamiento de las células cromafines con YC-1, aparece una menor cantidad de ADN, lo cual revela que existe una pérdida celular, y que éste efecto no es prevenido por el tratamiento con ODQ.



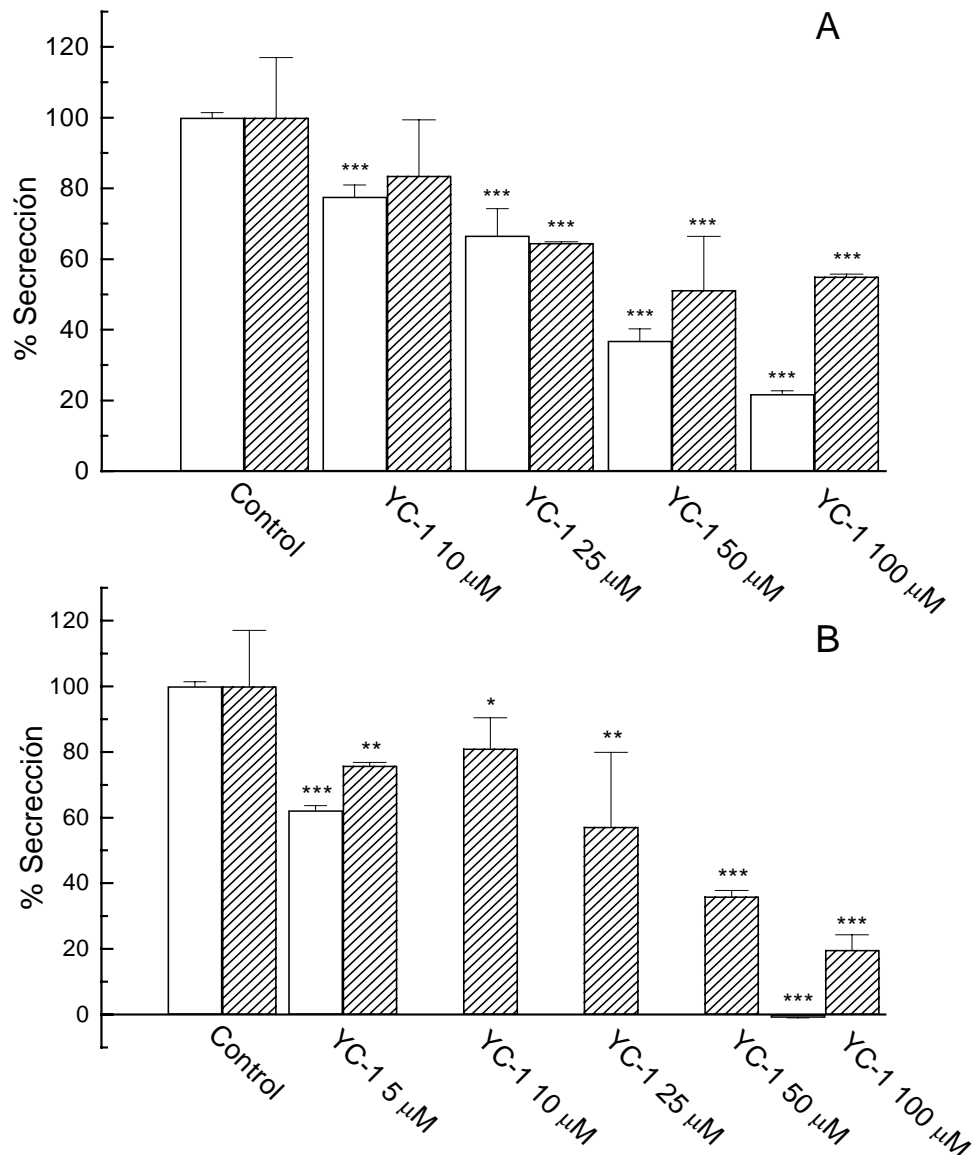
**Figura IV.42. Cuantificación del ADN de células cromafines.**

Las células cromafines se trataron durante 24 horas con las drogas ensayadas. El valor 100 se corresponde con 3502 ng ADN/pocillo en células cromafines. Los resultados representados son la media de dos experimentos realizados en triplicado  $\pm$  S.E.

#### 6.4. Estudio de la funcionalidad de células cromafines

La capacidad secretora de las células cromafines nos permitió realizar un estudio de la funcionalidad de las mismas. Las células cromafines secretan catecolaminas en respuesta a estímulos que incrementan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El estudio de la liberación de dichas sustancias tras la estimulación, permite valorar su estado funcional.

Para realizar este estudio, se introdujeron concentraciones crecientes de YC-1, junto con acetilcolina 100  $\mu$ M o KCl 40 mM, sometiéndolo a las células a una coestimulación de 2 minutos y cuantificando a continuación las catecolaminas secretadas. Los resultados presentados en la figura 43A muestran que el YC-1 disminuyó la secreción de forma muy significativa en ambos casos de estimulación. El hecho de que no solo presente este efecto inhibitorio sobre la estimulación con acetilcolina, si no que se mantenga de una magnitud comparable al introducir despolarización con  $K^+$ , nos asegura que no se trata de un efecto sobre los receptores nicotínicos.



**Figura IV.43. Secreción de catecolaminas.** Cuantificación de las catecolaminas secretadas por células cromafines por coestimulación de 2min con concentraciones crecientes de YC-1 y 100 $\mu$ M Acetilcolina (barras abiertas), o 40 mM KCl (barras grises) directamente (A) o tras preincubación de 30 min con las concentraciones indicadas de YC-1 (B). Los valores representados son la media de dos experimentos realizados en triplicado  $\pm$  S.E.

La preincubación de las células durante 30 min con las concentraciones crecientes de YC-1, que se representa en la figura 43B, para posteriormente someterlas a una estimulación muestra una inhibición aún mayor de la secreción que la obtenida en el caso en el que el YC-1 se adicionó junto con el secretagogo. La inhibición llega a ser de un 100% a la concentración más alta ensayada, YC-1 100  $\mu$ M, cuando la estimulación se realiza con acetilcolina. A esta misma concentración pero estimulando con  $K^+$ , la inhibición no es completa pero la secreción disminuye de forma extremadamente significativa.

El estudio de las catecolaminas totales y la secreción basal no mostró diferencias significativas. Esto, junto con el hecho de que la inhibición de la secreción por la ruta NO/GMPc precisa tiempos más largos de 2 minutos (Rodríguez-Pascual et al., 1995b) indica que el efecto de YC-1 se debe a una interacción del propio compuesto con algún elemento de la maquinaria secretora.

### 6.5. Estudio de la viabilidad celular

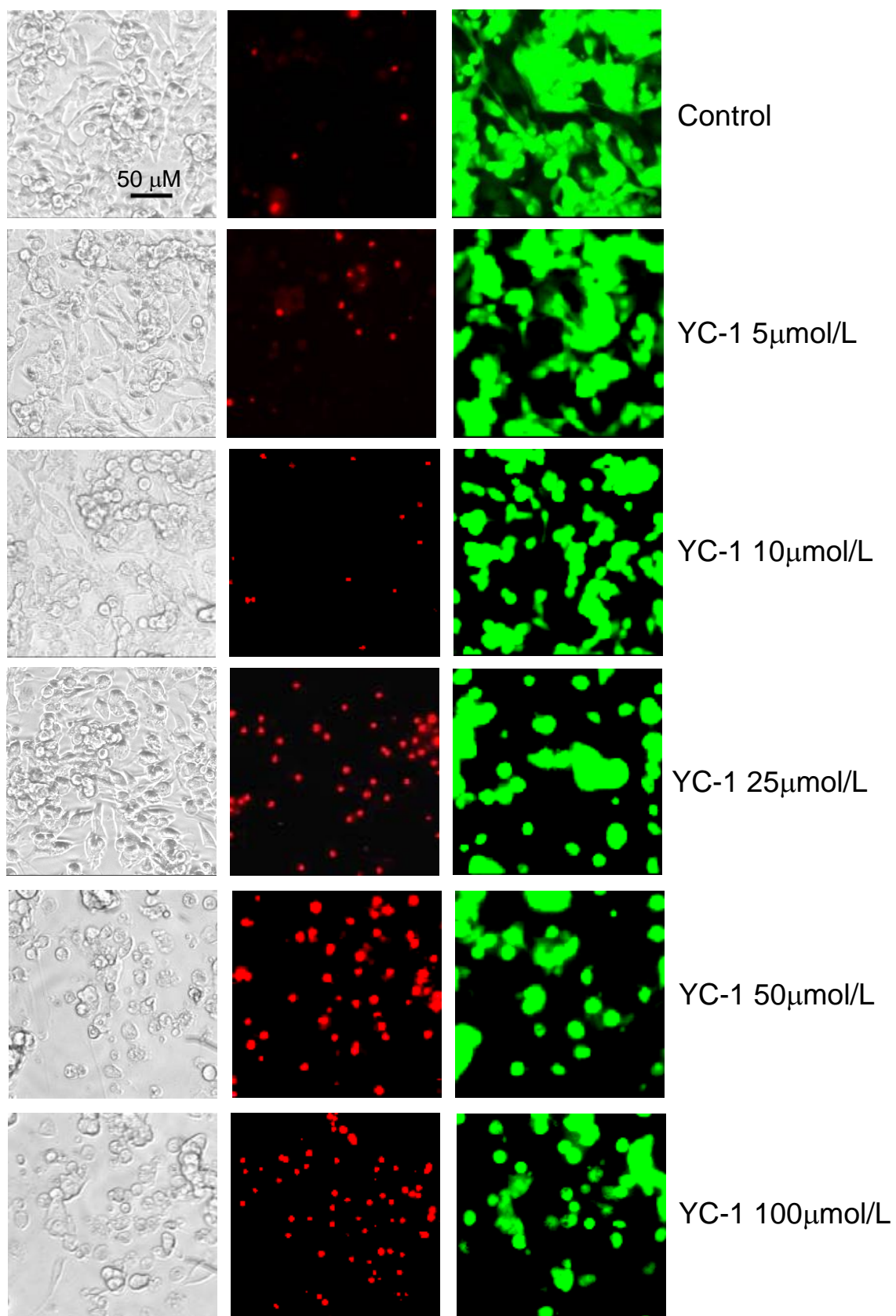
Una vez comprobado que el YC-1 era capaz de desorganizar el citoesqueleto celular, procedimos a comprobar si estos cambios podían indicar la existencia de citotoxicidad. Para ello utilizamos sondas fluorescentes que distinguen simultáneamente entre células vivas y muertas. En la figura 44 se muestran campos de células tratadas con concentraciones crecientes de YC-1, o bien sin tratamiento, durante 48 horas. En ninguno de los dos tipos celulares en los que se realizó el estudio se retiró el suero 24 horas antes de la incubación con las sondas para evitar inducción de citotoxicidad por falta de factores de crecimiento.

Los paneles B de cada una de las figuras, presentan las imágenes de las células muertas, esto es, marcadas con el homodímero de etidio por unión a los ácidos nucleicos de forma dosis dependiente. La fluorescencia con esta sonda aumenta cuanto mayor es la dosis de YC-1 con la que se ha realizado el tratamiento. Simultáneamente, podemos observar en los paneles C correspondientes a cada campo, una disminución en el marcaje con calceína-AM, indicativo de células vivas.

Estos resultados indican la existencia de citotoxicidad por tratamiento prolongado con YC-1.

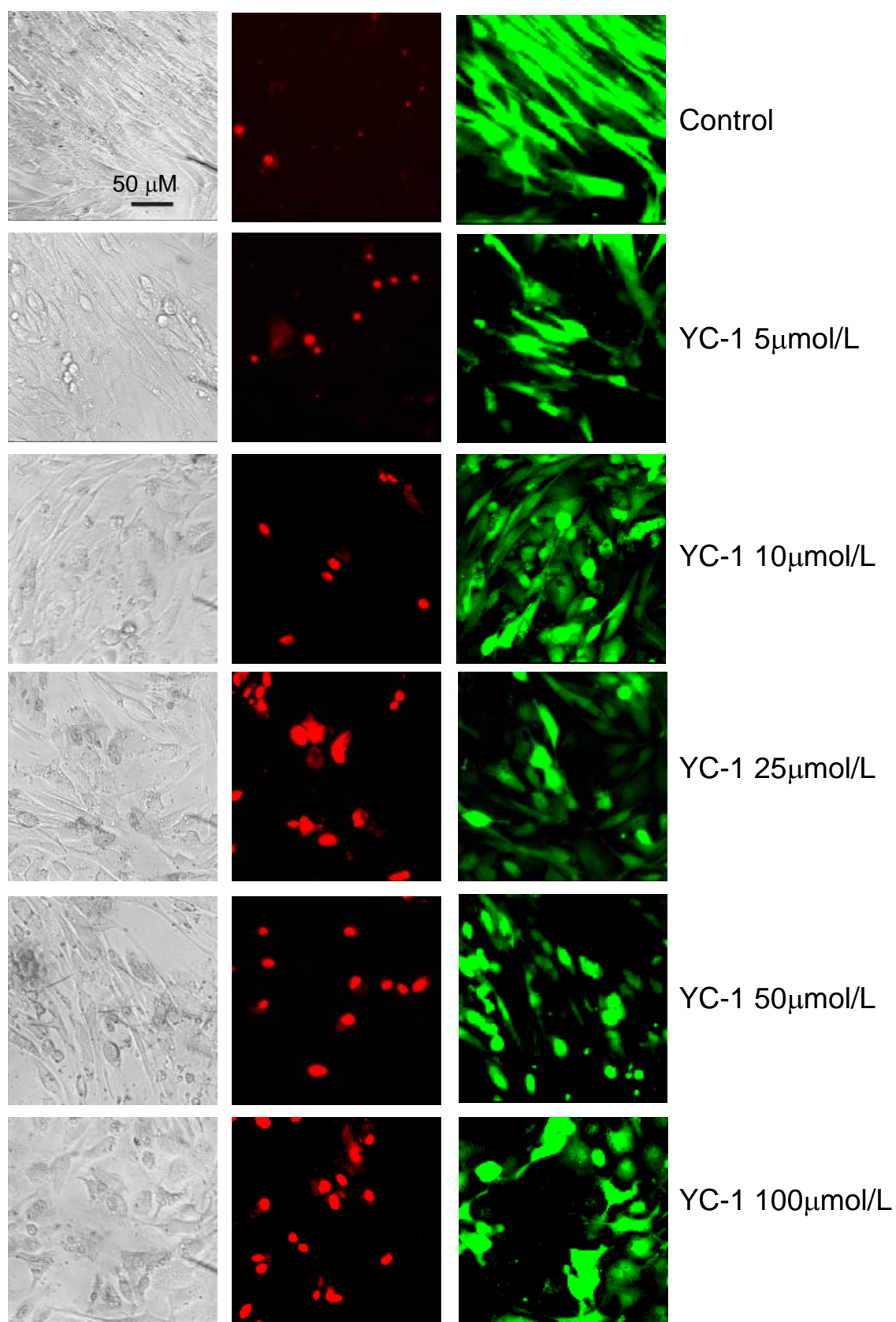
La introducción durante el tratamiento de ODQ 10  $\mu$ M, no fue capaz de prevenir estos efectos (resultados no presentados).

## Células cromafines





## Células endoteliales



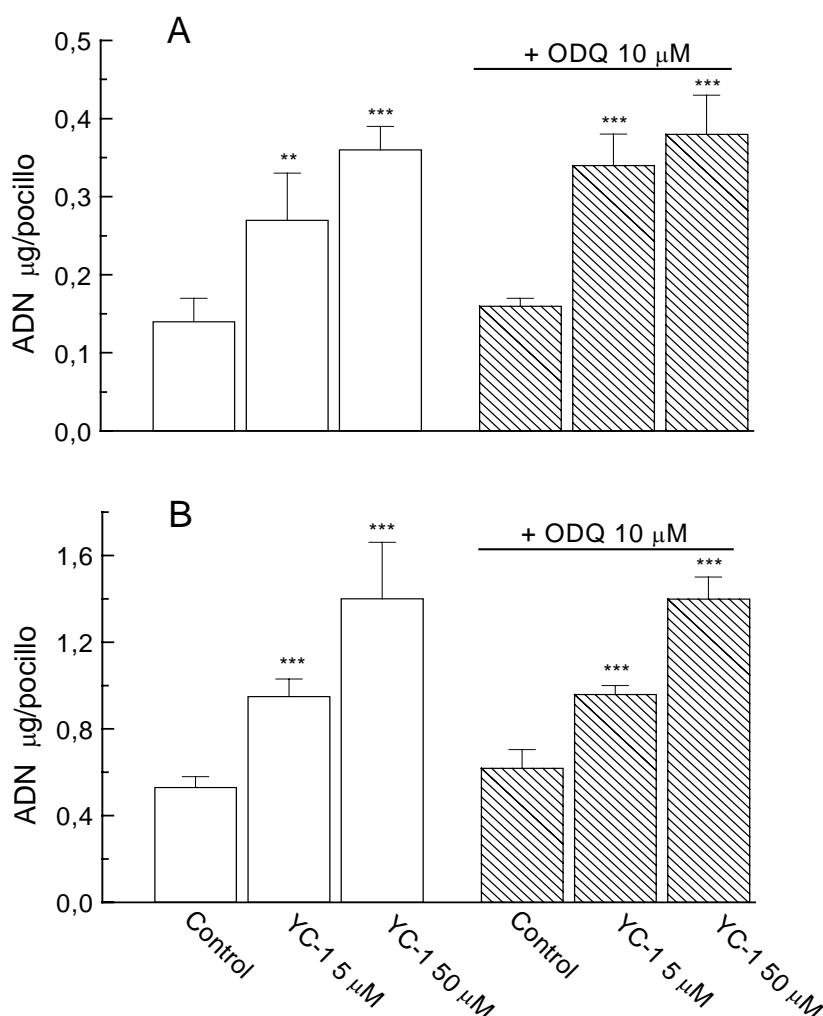
**Figura IV. 44. Estudio de la viabilidad celular.**





### 6.6. Estudio de la integridad del ADN celular

Los cambios morfológicos como la desorganización del citoesqueleto, pérdida de funcionalidad y de viabilidad celular, son síntomas inequívocos de daño celular. Los experimentos que se describen a continuación se diseñaron para determinar si la muerte celular se debía a un proceso de necrosis o por el contrario el YC-1 desencadenaba una muerte celular programada o apoptosis. Existen algunas diferencias entre ambos procesos que nos pueden dar la clave para conocer cual de ellos se está produciendo. Una de las consecuencias más señaladas de la apoptosis es la fragmentación del ADN. Una vez que se ha desencadenado la señal apoptótica y cualquiera que sea su origen, ésta desemboca en la degradación de los ácidos desoxirribonucleicos nucleares, originando fragmentos de ADN múltiplos de 150 o 200 pares de bases, que son capaces de salir del núcleo por poros que se originan en la membrana nuclear.

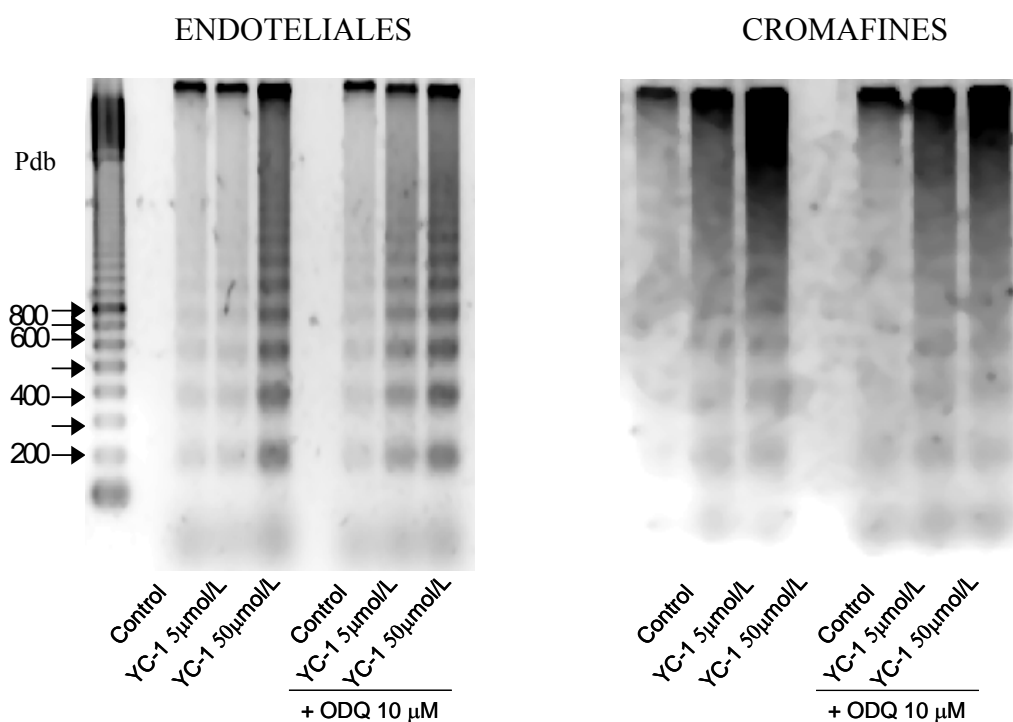


**Figura IV.45. Presencia de ADN en el citosol celular.** Cuantificación de los ADNs recogidos de células endoteliales (A) y cromafines (B) sometidas a distintos tratamientos con YC-1 que originan fragmentación del material genético y su salida del núcleo. Los valores representados son la media de dos experimentos realizados en triplicado  $\pm$  S.E.

Por este motivo una de las formas de determinar si la citotoxicidad que estábamos detectando era debido a un proceso apoptótico, se determinó la cantidad de ADN presente en el citosol. Para ello, mediante una técnica que permite extraer el ADN citosólico, dejando intactos los núcleos, se llevó a cabo la medida de la cantidad de este ácido nucleico presente en el citosol.

Como se muestra en la figura 45, el tratamiento con YC-1 a dosis de 5  $\mu$ M, provocaron un incremento de 1,8 veces en la cantidad de ADN que había salido al citosol, y con YC-1 50  $\mu$ M se aumentó 2,6 veces esta cantidad respecto al control. Además, el tratamiento simultáneo con ODQ, como se venía realizando en todos los ensayos descritos, no previno esta fragmentación del material genético celular. Muy al contrario, la inhibición de la actividad GCs, pareció potenciar el efecto del YC-1.

A continuación, realizamos una electroforesis en geles de agarosa de los mismos ADNs extraídos de los citosoles celulares. La aparición de un patrón de fragmentación en escalera, muy característico de células apoptóticas, reafirmó el hecho de que la citotoxicidad observada en los dos tipos celulares, era debida a la desencadenación de un proceso apoptótico a raíz del tratamiento con YC-1.

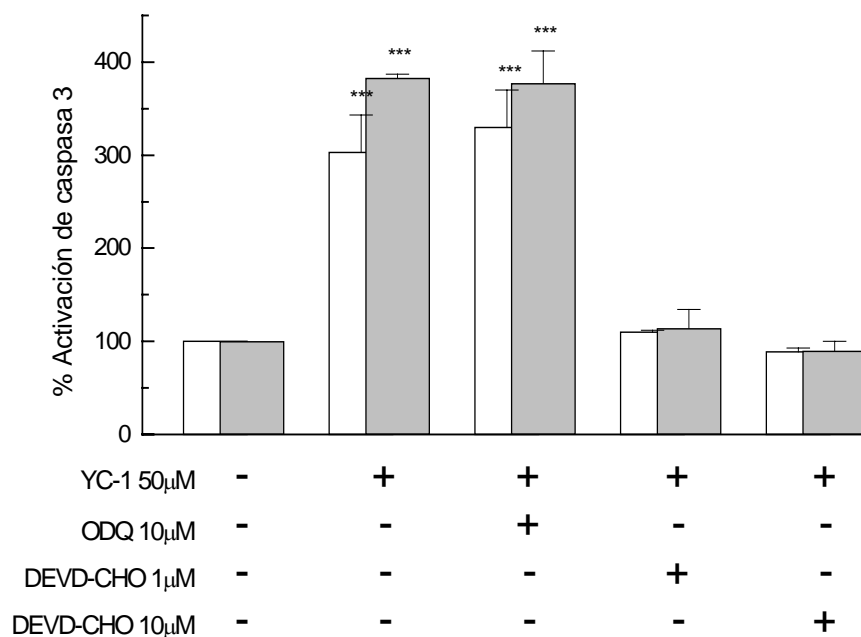


**Figura IV.46. Electroforesis de ADN.** Las muestras de ADN extraído del citosol celular, se corrieron en un gel de agarosa 2% y se tiñó con un colorante específico para ácidos nucleicos.

### 6.7. Estudio de la actividad de caspasas

El papel de las caspasas como cascada de proteasas implicadas directamente en los procesos apoptóticos ha sido ampliamente descrito. La activación de estas enzimas es la responsable de la fragmentación del ADN nuclear. Aunque existen varias de estas proteínas, y son interactivadas entre sí, una de las más estudiadas como señal de apoptosis, es la caspasa 3. Sea cual sea el mecanismo iniciador de la señal apoptótica, el proceso pasa con mucha probabilidad por la activación de esta proteasa.

Por ello en nuestro trabajo la medida de la actividad de la caspasa 3, culminó la determinación de la existencia de un proceso apoptótico desencadenado por el tratamiento prolongado con YC-1.



**Figura IV.47. Medida de la actividad de caspasa 3.**  
Determinación de la activación de caspasa 3 por tratamiento con YC-1 16 h en células cromafines (barras blancas), y endoteliales (barras grises).

Según se refleja en la figura 47, el tratamiento con YC-1 provoca el incremento de la actividad de caspasa-3. El ODQ no previno esta activación en ninguno de los casos. Además el hecho de que el DEVD-CHO, inhibidor de la caspasa 3, sea capaz de revertir completamente la medida de la actividad caspasa, garantiza la especificidad del ensayo.



Dado que el objetivo de este trabajo de investigación ha sido el estudio de la regulación de la enzima GCs en condiciones de activación fisiológicas, así como el fenómeno de tolerancia desarrollado tras un aporte de NO exógeno, nos planteamos en primer lugar la importancia de emular las condiciones que presumiblemente se producen *in vivo*. En la actualidad, se dispone de un amplio abanico de drogas que inciden sobre los elementos de la vía NO-GCs-PKG. Sin embargo, los datos que aparecen en los distintos trabajos que abordan temas relacionados con el NO reflejan la disparidad de concentraciones de agentes donadores de NO que se utilizan para activar la ruta. Como consecuencia de este amplio rango de concentraciones, aparecen efectos muy diversos, e incluso contrarios en distintos trabajos, que en realidad, son consecuencia del diferente grado de activación de la vía, o bien de la aparición de efectos colaterales desarrollados como consecuencia de las altas dosis de NO introducidas y que son independientes de la activación de la GCs.

Para comprender mejor cuales son los mecanismos que se ponen en marcha tras el estímulo con NO, se han estudiado distintos donadores de NO con el objeto de encontrar los compuestos y las dosis más apropiadas para simular las condiciones de estimulación natural o de tratamiento con vasodilatadores. Los donadores seleccionados para este estudio se escogieron en función de sus diferentes vidas medias y de sus diversas naturalezas químicas.

Los resultados de la caracterización demuestran que los cuatro compuestos liberadores de NO tienen potencias muy diferentes entre sí en cuanto a su capacidad de incrementar los niveles de GMPc en las células cromafines bovinas. Estas diferencias pueden explicarse en cuanto a sus tasas de activación específicas y a los mecanismos por los cuales producen NO. El rango de potencias obtenido en cuanto a la estimulación de la síntesis de GMPc ha sido DEA/NO>SPER/NO>SNP>SNAP.

El DEA/NO presenta una  $EC_{50}$  de 0,4  $\mu$ M, siendo el más potente entre los compuestos estudiados. Este valor se correlaciona muy bien con el obtenido para la estimulación de células endoteliales por Mayer et al. (1995), y para la de la enzima GCs purificada a partir de pulmón bovino (Friebe et al., 1996). Sin embargo, la  $EC_{50}$  obtenida para la acumulación de GMPc por tratamiento con SNAP, es un orden de magnitud más alto que el obtenido para SNP, resultados contrarios a los datos publicados por otros autores para cardiomiocitos (Davis et al., 1997), así como para células NIE-115 de neuroblastoma de ratón (Lipton et al., 1993) y rodajas de cerebelo de rata (Southam & Garthwaite, 1991). Esta discrepancia se puede justificar debido a los distintos tipos celulares empleados en los estudios, así como por el hecho de que la liberación de NO a partir de SNAP varía según la composición del medio en el que se encuentre disuelto.

Como se ha descrito en la introducción, la presencia de GSH incrementa la liberación de NO a partir de nitrosotioles. Este efecto provoca que el valor de  $EC_{50}$  para la estimulación de los niveles de GMPc por SNAP se reduzca en aproximadamente dos órdenes de magnitud.

Para comprobar si la distinta potencia en la activación de la GCs estaba relacionada con una diferente liberación de NO a partir de estos compuestos, se midió la cantidad de NO liberado por cada uno de ellos a partir de concentraciones crecientes del compuesto de partida. A pesar de que el método de la oxidación de hemoglobina precisa de unas condiciones de trabajo muy estrictas para asegurar una medida correcta del NO, tanto su sensibilidad (el límite de detección teórico alcanza  $1,3 \mu\text{M}$ ) como la posibilidad de realizar medidas en continuo, hacen de este método un instrumento muy atractivo para la cuantificación (Murphy & Noack, 1994).

En presencia de células, condiciones en las que el SNP libera NO, la reacción con la hemoglobina se incrementó durante los primeros 15 minutos de medida, cayendo posteriormente. Este efecto revela que se está produciendo alguna otra reacción de oxido-reducción paralela que enmascara el verdadero efecto del NO liberado. De todos modos, de acuerdo con estudios previos se puede afirmar que el SNP libera pequeñas cantidades de NO a lo largo de periodos de tiempo prolongados (Bates et al., 1992; Rao et al., 1991). En nuestros estudios, y con las condiciones experimentales que se han empleado, no hemos detectado ninguna liberación de NO a partir de SNP en ausencia de células, hecho lógico dado que, aunque el mecanismo de descomposición de SNP no está aún bien definido, se sabe que este compuesto no libera NO de manera espontánea, sino que sólo se produce por fotólisis, adición de agentes reductores, o por transformación metabólica (Bates et al., 1992; Murphy & Noack, 1994).

El estudio de los donadores pertenecientes a la familia de los NONOatos, la SPER/NO y DEA/NO, condujo a la determinación de unas vidas medias y unas cantidades de NO liberadas a partir de éstos comparables a las descritas por otros autores en condiciones experimentales similares (Ramamurthi & Lewis, 1997). Por otro lado, también coinciden con el comportamiento esperado según el modelo matemático teórico establecido por Schmidt et al. (1997). La estequiometría ( $e_{\text{NO}}$ ) calculada para la SPER/NO a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{pH}=7,4$  fue de  $1:1,7-1,9$ , muy similar a la que habían sido descrita por Ramammurthi & Lewis (1997) de  $1,7$  y Keefer et al. (1996) de dos moléculas de NO a partir de cada molécula de SPER/NO. Para el DEA/NO la estequiometría se ha calculado en  $1:1,2$ . Este valor también está de acuerdo con datos descritos anteriormente por varios grupos ( $e_{\text{NO}}$  de  $1$  (Schmidt et al., 1997) y de  $1,5$  (Ramamurthi & Lewis, 1997)). Es importante señalar que, aunque según la estructura química de este compuesto la estequiometría esperada fuera de  $2$ , la gran inestabilidad del mismo hace que la estequiometría pueda variar de unas preparaciones a otras.

Sin embargo, la estequiometría del SNAP ha sido objeto de gran controversia en los estudios realizados por diferentes grupos, describiendo concentraciones de NO liberadas a partir de éste compuesto muy dispares (Matthews et al., 1996; Singh et al., 1996). En este trabajo de investigación se han empleado los dos métodos ya descritos para la determinación del NO liberado, obteniéndose resultados muy

similares entre ambos, lo cual nos asegura la fiabilidad de la medida obtenida. Además, estos valores coinciden con los obtenidos por algunos autores siguiendo el mismo método para realizar la determinación (Läfers & Gyllenhammar, 1995), aunque resultan algo inferiores a los obtenidos por otros grupos (Ioannidis et al., 1996). El mecanismo de liberación de NO a partir de nitrosotioles se encuentra lejos de estar bien determinado, y ha demostrado ser altamente dependiente de los diversos factores que integran el sistema como la concentración de tioles reducidos en el medio y los metales de transición presentes (Dicks et al., 1996; Gordge et al., 1996; Singh et al., 1996). En un tampón fosfato que contiene un quelante de metales de carácter no oxido-reductor, como es el DTPA, se ha detectado una liberación transitoria de NO a partir de SNAP correspondiente a menos de un 0,1% del donador presente en condiciones de pH y temperatura fisiológicos (Haddah et al., 1994). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales hemos detectado una liberación de NO lineal a partir de SNAP a lo largo del tiempo. La cantidad de NO liberado a los 60 min representa menos de un 2% del SNAP presente, indicando que este compuesto tiene una vida media muy larga. Sin embargo, al añadir GSH en el medio, tras 15 minutos de incubación la cantidad de NO liberado era mucho mayor.

La medida de NO generado a partir de SNAP en un medio en ausencia de células fue cuatro veces superior al detectado en presencia de las mismas. Este hecho se puede explicar por las diferencias en el medio de reacción, dado que la presencia de células contribuye en gran medida al contenido total de iones afectando a la liberación de NO. Además, la inactivación del NO en presencia de células es más rápida cuanto mayor es la concentración de NO (Kharitonov et al., 1994; Goldstein & Czapski, 1995). Apoyando esta idea, se ha demostrado que diversos donadores de NO son dos ordenes de magnitud más potentes en la estimulación de preparaciones de GCs purificada que en rodajas de cerebelo (Knowles et al., 1990; Southam & Garthwaite, 1991).

Existe una buena correlación entre la producción de NO y los incrementos de GMPc obtenidos cuando se introducen los NONOatos como agentes estimulantes. Las cantidades de NO producido por los dos NONOatos objeto de estudio, a concentraciones que originan las acumulaciones máximas y submáximas ( $EC_{50}$ ) de GMPc, son dos y tres veces mayores que los valores descritos para la constante de disociación del NO de la GCs activada y que la concentración de NO que origina la máxima acumulación del complejo nitrosilo, respectivamente (Stone & Marletta, 1996). En cualquier caso, estas diferencias se podrían explicar por el hecho de que las medidas realizadas en este estudio son de tipo acumulativo, de forma que el NO que se va liberando reacciona inmediatamente con la hemoglobina, lo cual lo protege de la inactivación por parte de las células y, aunque a concentraciones bajas de NO parece ser muy estable, su inactivación es mayor en medios en presencia de células o tejidos (Knowles et al., 1990; Southam & Garthwaite, 1991).



El comportamiento del SNAP es mucho más complicado. No se ha encontrado una correlación entre el incremento de los niveles de GMPc y la producción de NO. Además, se han necesitado niveles más altos de NO generado a partir de SNAP para conseguir una elevación máxima o submáxima de los niveles de GMPc. Los experimentos realizados en función del tiempo revelan que los niveles de GMPc siguen una cinética paralela a la producción de NO a partir de NONOatos, e incluso a partir del SNP si asumimos una liberación continua de NO. Sin embargo, cuando se introdujo el SNAP se alcanzó un nivel de GMPc estable tras 15 min, a pesar de que la concentración utilizada no causó la estimulación máxima de la síntesis de GMPc y se ha observado una producción lineal de NO a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en experimentos dosis respuesta se ha detectado un efecto bifásico sólo cuando se utilizó el SNAP como donador de NO, disminuyéndose el incremento inducido por el compuesto al introducir concentraciones de éste superiores a 1 mM. Un perfil similar se ha descrito para el efecto del SNAP en rodajas de cerebelo de rata (Southam & Garthwaite, 1991), así como cuando se trató la GCs purificada con peroxinitritos en presencia de GSH (Friebe et al., 1996). En experimentos realizados con un compuesto análogo de SNAP que carece de NO, éste no modificó los niveles de GMPc basales ni los estimulados por SNP. Por lo tanto, el efecto inhibitorio parece deberse a un mecanismo en el que participa el SNAP como agente donador de NO, y es independiente del producto resultante una vez que se ha liberado el NO. En presencia de GSH 1 mM, el efecto inhibitorio se observó incluso a concentraciones más bajas de SNAP. Estos resultados, junto con el hecho de que sólo el SNAP a concentraciones altas produce la caída en los niveles de GMPc, podría indicar que este compuesto puede haber producido una modificación de la enzima, y dependiendo del alcance de esta modificación, se puede observar una desensibilización e incluso una inhibición. Como ya se adelantaba en la introducción, otros estudios han encontrado que el mecanismo por el cual se produce la desensibilización de la GCs se puede deber a una oxidación o bien a una nitrosilación de grupos tioles libres cruciales para la actividad de la enzima (Davis et al., 1997). La nitrosilación se ha descrito recientemente como una modulación de la función de varias proteínas incluyendo algunas asociadas a membrana, proteínas citosólicas y nucleares, estando favorecido este mecanismo por la presencia de S-nitrosotioles (Lipton et al., 1993; Singh et al., 1996; Kaye et al., 1997).

Los cuatro compuestos estudiados han sido capaces de incrementar los niveles de GMPc hasta niveles muy elevados en células cromafines bovinas, indicando la gran capacidad de estas células de responder a NO. En estudios previos, se ha descrito que la mayoría de las células cromafines expresan NOS I así como las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la GCs (Schwarz et al., 1998), y que estas células responden a acetilcolina con incrementos transitorios de la actividad de NOS y de los niveles de GMPc (Rodríguez-Pascual et al., 1995b; Schwarz et al., 1998). Dado que la respuesta fisiológica es transitoria, los donadores de NO de vida media corta como el DEA/NO pueden emular de forma bastante fiable la activación endógena de la vía NOS/GCs

en estas células. En general, se conoce bastante bien que mientras las formas constitutivas de NOS cuando se activan producen pequeñas cantidades de NO durante periodos de tiempo cortos, las formas inducibles de la enzima inducen una liberación prolongada de grandes cantidades de NO (Förstermann et al., 1995). Por lo tanto, los donadores de vida media corta a concentraciones bajas representan la manera más fiable de imitar el comportamiento del NO sintetizado de manera endógena por una isoforma constitutiva, mientras que los de vida media más larga imitarían mejor la activación de la isoforma inducible.

Los datos obtenidos apoyan la idea de que diferentes donadores de NO poseen potencias muy distintas a la hora de activar la GCs, y esto se correlaciona con su capacidad de liberar NO, excepto en el caso de SNAP, donde parece que está implicado un mecanismo más complejo. Debe tenerse en cuenta que son necesarias concentraciones muy bajas de NO para activar a la enzima GCs, comparables a las que se describen en este trabajo. Por ello, es necesario ser cuidadosos a la hora de fijar las condiciones en las que se van a realizar los experimentos, de forma que se escojan los donadores más adecuados, así como las concentraciones más razonables para evitar reacciones imprevistas.

Una vez comprendida la capacidad de activación de la ruta por los distintos donadores, se abordó el estudio de la regulación de la vía. Las alteraciones en la regulación de la GCs contribuyen a la aparición de condiciones clínicas asociadas con respuestas anómalas a NO como los desórdenes vasculares y la disfunción eréctil (Katz et al., 1992; Christ et al., 1995). Por ello, es importante determinar cuál es el mecanismo de regulación implicado.

En células vivas, la desactivación de GCs se produce con una  $t_{1/2}$  de unos pocos segundos, permitiendo a la GCs responder de forma dinámica a fluctuaciones en la concentración de NO. La desensibilización debe, por tanto, representar un mecanismo de regulación temprano de la actividad de GCs que se desencadena en los primeros momentos tras el estímulo con NO.

Diversos estudios han demostrado que la preincubación de las células o extractos celulares con NO conducían a una atenuación de la activación de GCs con NO a tiempos cortos en los que los niveles de enzima aún no estaban siendo afectados (Papapetropoulos et al., 1996b; 1998). Algunos autores han propuesto que esta desensibilización aparecida para el NO exógeno es un mecanismo que se produce *in vivo*, y que no está mediado por depleción del sustrato ni por inhibición de la enzima por su propio producto (Bellamy et al., 2000). Además, se ha demostrado que el mecanismo de desensibilización se perdía en lisados celulares, sugiriendo la necesidad de otro elemento citosólico implicado (Bunn et al., 1986; Gerzer et al., 1981). En cualquier caso, no se ha determinado si este efecto está mediado por GMPc.

En nuestro estudio nos hemos planteado si la activación de PKG regularía la actividad de la GCs inducida por NO. El pretratamiento de las células cromafines

con CNP, que estimula la producción de GMPc y la activación de PKG (Rodríguez-Pascual et al., 1996), o alternativamente con un análogo de GMPc permeable a las células (Sp-8-Br-PET-cGMPS), el cual es un potente activador de PKG, produjo una reducción de los niveles de GMPc alcanzados por una posterior estimulación con SNP. Estos resultados, junto con el hecho de que el inhibidor selectivo de PKG, el KT-5823, a una concentración de  $0,5 \mu\text{M}$  sea capaz de prevenir de manera efectiva el efecto de CNP, indican que la PKG participa en el mecanismo de regulación de la vía, regulando los niveles de GMPc intracelular. La homeostasis dinámica de los niveles de GMPc resulta del equilibrio entre la síntesis y la degradación del nucleótido cíclico; esto implica que los efectos observados pueden ser explicados por la activación de las fosfodiesterasas específicas o bien por la inhibición de la enzima GCs.

Recientemente, se ha demostrado que, en tejido vascular, el factor natriurético tipo A (ANF) induce la fosforilación y activación de fosfodiesterasas (Wyatt et al., 1998). Sin embargo, diversos resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de que sea la actividad GCs la que está siendo modificada más que la degradación del nucleótido cíclico. En primer lugar, todos los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas, el IBMX, evitando así los posibles efectos debidos a los cambios de la actividad de fosfodiesterasas. Por otro lado, la función tiempo para la activación de fosfodiesterasas por fosforilación dependiente de PKG reveló que ésta se incrementaba en el primer minuto de activación mientras que, a tiempos más largos, la actividad de fosfodiesterasa cae de manera muy significativa alcanzando niveles basales, tiempo al que se han realizado las observaciones que nosotros presentamos (Wyatt et al., 1998). Por otro lado, otro dato que apoyaría la modificación de la actividad GCs es que algunos tratamientos que producen una acumulación mayor de GMPc cuando ésta se estimulaba con NO, tales como la preincubación con inhibidores de PKG, no fueron capaces de incrementar la acumulación de GMPc inducida por la activación de una GC de membrana con CNP. El efecto inhibitorio observado por la pre-estimulación con CNP, no se potenció por inhibición de proteínas fosfatasas, sino que la presencia de diferentes inhibidores de proteínas fosfatasas previno el efecto causado por el CNP. En este sentido, el efecto de CNP fue emulado por NECA, descrito anteriormente como un activador de una proteína fosfatasa en estas células (Mateo et al., 1995). Por tanto, es posible que el CNP esté activando una proteína fosfatasa a través de la activación de PKG. Esta idea está apoyada por los resultados de otros autores que han demostrado la participación de la activación de una proteína fosfatasa del tipo 2A en varias acciones fisiológicas mediadas por PKG, tales como el incremento en las corrientes de  $\text{K}^+$  inducidas por  $\text{Ca}^{2+}$  en varios tipos celulares (White et al., 1993; Zhou et al., 1996).

En los resultados presentados se han analizado los efectos de varios inhibidores de PKG sobre los niveles de GMPc basales o los inducidos por SNP. Todos los inhibidores de PKG ensayados incrementaron ambos niveles del nucleótido cíclico, siendo los más potentes en este efecto el Rp-8-Br-PET-GMPS y el KT-5823. Estos

compuestos inhiben la PKG por interacción con el sitio regulador o con el catalítico respectivamente, y ambos son muy selectivos y específicos (Kase et al., 1987; Enan & Matsumura, 1992). Estos datos indican que la actividad tónica de PKG produce una retroinhibición de la GCs. Es importante señalar el hecho de que en este trabajo experimental, las condiciones basales consisten en una preincubación de las células con IBMX 0,5 mM durante 30 min. Este tratamiento produce un incremento de los niveles de GMPc de dos veces con respecto a los valores observados en células no tratadas y produjo una potenciación importante de los niveles del nucleótido cíclico detectados tras estimulación (Rodríguez-Pascual et al., 1996). Por este motivo se eligieron estas condiciones experimentales para la medida de GMPc. Por lo tanto, este tratamiento podría ser responsable por sí mismo de la activación de la PKG en nuestras condiciones basales.

Los inhibidores de proteínas fosfatasa imitaron los efectos de los inhibidores de PKG, aunque la magnitud de su efecto fue siempre menor que la observada en presencia de los últimos. El hecho de que una concentración de 100 nM de ácido okadaico y de 10 nM de caliculina A potencie el efecto estimulador del SNP, y a su vez prevenga del efecto inhibitorio causado tanto por CNP como por NECA, apoya la idea de que exista una proteína fosfatasa de tipo 2A implicada en el mecanismo. Aunque estos compuestos pueden inhibir tanto a la PP1 como a la PP2A, la concentración de ácido okadaico necesaria para inhibir a la primera en células intactas es mucho mayor que la que se ha empleado en este estudio (Klumpp et al., 1990).

La caliculina A presenta una potencia mayor que la del ácido okadaico en la prevención del efecto del CNP. Este hecho podría explicarse por una diferencia en la permeabilidad de los compuestos, lo cual implica que se alcancen concentraciones diferentes de cada uno de ellos en el interior de las células, y que el grado de inhibición de las diferentes proteínas fosfatasas sea diferente. En cualquier caso, la cipermetrina 10 nM presenta el mismo efecto. Este compuesto se ha descrito como un inhibidor potente y específico de la proteína fosfatasa tipo 2B, sin afectar a las proteínas fosfatasas 1 y 2A, al menos *in vitro*. Aunque con los datos de los que se dispone es difícil saber cual es el tipo de fosfatasa implicada en el proceso y no se puede descartar ninguna posibilidad, es razonable pensar que sea la PP2A la enzima implicada y que en este caso la cipermetrina esté afectando a este tipo de fosfatasa, ya que no existen datos de que la PKG active a la PP2B, mientras que la activación de PP2A es un fenómeno bien documentado (White et al., 1993; Zhou et al., 1996). Por otro lado, la activación de la PP2B depende de la interacción  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina con la enzima, y tanto el CNP como el NECA han sido incapaces de inducir ningún cambio en los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines, manteniéndose los niveles de calcio intracelular en 150-170 nM (Mateo et al., 1995; Rodríguez-Pascual et al., 1996). Por lo tanto, no es probable que la PP2B esté implicada en el mecanismo de regulación descrito, aunque existen muchos ejemplos en la literatura sobre la activación cruzada de diferentes proteínas fosfatasas, que podría también explicar

porqué inhibidores de distintas proteínas fosfatasa tienen el mismo efecto (Chen et al., 1998). De acuerdo con estos resultados existe una inhibición tónica de GCs en ausencia de estimulación, que podría ser el resultado de una variación del grado de fosforilación de varias proteínas. Un posible mecanismo que podría explicar estos resultados es que la activación de PKG de lugar a la activación de una proteína fosfatasa que, a su vez, defosforile a la GCs u otra proteína reguladora, causando a la inhibición de su actividad.

En los experimentos de inmunoprecipitación de la enzima GCs, observamos una clara relación entre el grado de fosforilación de la subunidad  $\beta$  de la enzima con la actividad enzimática, apoyando la idea de que es la modificación del estado de fosforilación de la enzima en sí misma, y no el de otras proteínas reguladoras asociadas, la responsable de los cambios observados en su actividad. Tanto el CNP como el NECA, los cuales causaron una inhibición de la respuesta a SNP, disminuyeron el grado de fosforilación de la subunidad  $\beta$  de la GCs. En cualquier caso, la preincubación con KT-5823 incrementó tanto la fosforilación de la subunidad  $\beta$  como la acumulación de GMPc inducida por SNP. Estos resultados confirman estudios previos que habían puesto de manifiesto que la GCs purificada a partir de cerebro era fosforilada tanto por PKC como por PKA, y en ambos casos, la fosforilación de la enzima daba lugar a un incremento de su actividad. Sin embargo, estos autores no investigaron cual era la subunidad donde tenía lugar la modificación (Zwiler et al., 1981; 1985). En experimentos realizados con células PC12 se ha descrito que la fosforilación de la GCs en respuesta a la activación de PKC. Además, el tratamiento de estas células con ésteres de forbol resultó en un incremento de la síntesis de GMPc, indicando que la fosforilación incrementaba la actividad de la GCs (Louis et al., 1993). El hecho de que el CNP disminuya la fosforilación de la subunidad  $\beta$  y que el KT-5823 la incremente, apoya la idea de que la PKG media un mecanismo de defosforilación responsable de estos efectos, y que actúa tanto sobre la actividad basal como sobre la estimulada.

La cuestión que queda aún sin resolver y que precisa de mayor investigación se refiere a la proteína responsable de la fosforilación de la GCs. De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, debe tratarse de una serina quinasa, dado que la inmunoreactividad sólo se ha detectado introduciendo el anticuerpo anti-fosfoerina. De todos modos, dado que los anticuerpos contra residuos de treonina y tirosina utilizados son monoclonales y sólo reconocen epítomos específicos, no se puede descartar que exista también una fosforilación de la enzima en este tipo de residuos. En cualquier caso, los experimentos realizados en células marcadas metabólicamente con  $P^{32}$ , coinciden en magnitud con los resultados obtenidos en los experimentos realizados empleando el anticuerpo contra residuos de serina fosforilados.

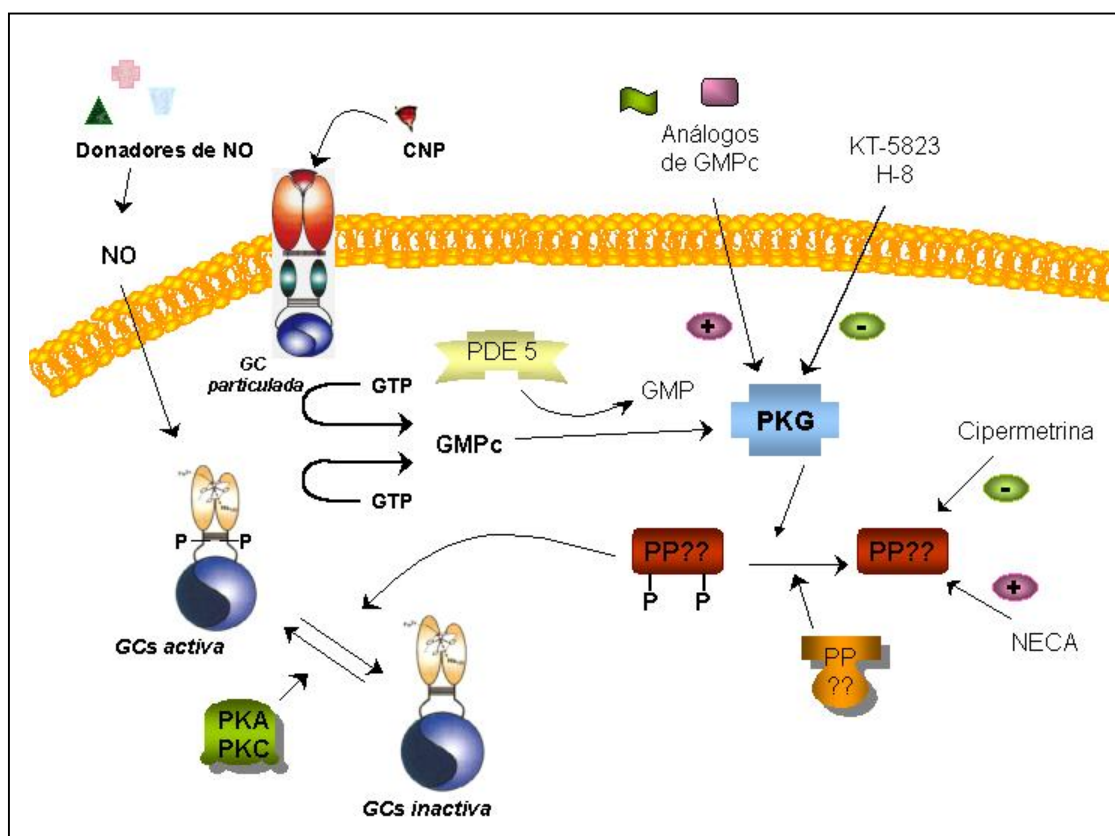
Con anterioridad, otros autores han descrito que las enzimas guanilato ciclasas A y B (receptores de péptidos natriuréticos tipo A y B), están sometidas a un mecanismo de

desensibilización basado en la defosforilación de las mismas. Ambos receptores están fosforilados en residuos de serina y treonina en células en reposo. Tras la estimulación inicial, la actividad de estas enzimas disminuye con una cinética que coincide con la defosforilación del receptor (Potter & Garbers, 1994; Potter, 1998). Aunque la proteína fosfatasa implicada en este mecanismo no se ha identificado, se ha demostrado que la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A es capaz de defosforilar y desensibilizar al receptor del péptido natriurético tipo B de células 3T3 *in vitro* (Potter, 1998). Recientemente, también se ha descrito un mecanismo de desensibilización de PKC mediante la defosforilación de la misma por PP1/2A (Thiels et al., 2000).

Por otro lado, la GCs presenta muchas similitudes con la adenilato ciclasa, cuya regulación por PKC ha sido descrita en diversos tipos celulares (Patrizio et al., 1997). Otra serie de evidencias que apoyan la idea de que estas enzimas están reguladas por un mecanismo de fosforilación es que la activación de PKC en pinealocitos de rata se traduce en un incremento de la síntesis de nucleótidos cíclicos (Ogiwara et al., 1998). Por tanto, la regulación de la actividad GCs que implica el proceso de fosforilación y defosforilación descrito en este trabajo, se incluye dentro de la diversidad de mecanismos reguladores de las enzimas productoras de nucleótidos cíclicos.

La implicación de la PKG en la regulación de los niveles de GMPc a través de la activación de la fosfodiesterasa 5 ha sido probada en células de músculo liso (Wyatt et al., 1998). Los resultados descritos en este trabajo demuestran la existencia de una retroinhibición de la guanilato ciclasa soluble, que puede representar un mecanismo de desensibilización regulando los niveles de la señal que lo desencadena, el GMPc. Es razonable pensar que los incrementos en el GMPc y la activación de la PKG conlleven a una inhibición de su síntesis además de la activación de su degradación. Esto implicaría que los niveles de GMPc y, por tanto, sus efectos fisiológicos, son determinantes para la regulación de su síntesis y su degradación.

El mecanismo de desensibilización de la GCs propuesto en el esquema es de gran importancia a la hora de comprender como se recupera el sistema de un estímulo y se prepara para recibir otra señal.



Sin embargo, el fenómeno al que se viene denominando tolerancia a nitrovasodilatadores no se explicaría por este mecanismo, ya que todas estas modificaciones son reversibles y resultan de la respuesta a un estímulo puntual. La vía de señalización permanecería inhibida sólo durante el tiempo necesario para que el sistema se recuperase y volviese a las condiciones iniciales. Sin embargo, cuando el estímulo se mantiene en el medio celular, es previsible que existan otras vías de regulación, sobre todo, si tenemos en cuenta la naturaleza altamente reactiva del NO y su capacidad de interactuar con numerosas proteínas, modificando su actividad (Stamler et al., 1992; Lipton et al., 1996; Jia et al., 1996).

Para estudiar cuales son las bases moleculares de la tolerancia, se han emulado las condiciones que conducen a dicho efecto mediante el tratamiento continuado con un donador de NO capaz de mantener una concentración constante en el medio. En estas condiciones se ha observado que, efectivamente, la capacidad de respuesta en cuanto a la producción de GMPc frente a un estímulo con dosis altas de NO se encontraba disminuida en más de un 50%. El máximo de inhibición se detectó a las 48 horas de tratamiento. Este fenómeno podría explicarse bien por un mecanismo que conlleve una disminución de la actividad enzimática como consecuencia de la modificación de residuos críticos que intervienen en el desarrollo de la reacción de síntesis de GMPc, o bien por una disminución de los niveles de la enzima GCs.

Las reacciones de oxido-reducción representan un mecanismo posible para la desactivación de enzimas. Estudios previos han demostrado que el estado de oxidación del átomo de hierro del grupo hemo y de residuos de cisteína de la proteína juegan un importante papel en el grado de actividad de la GCs. Se ha sugerido que la desactivación de la enzima podría ocurrir por reacción directa de un agente oxidante con el grupo hemo de la enzima, mientras que la oxidación de determinados grupos tioles podría ser responsable de una inhibición de la actividad, tanto en condiciones basales como de estimulación con NO (Dierks et al., 1998). Por otro lado, el grupo de Clementi et al. ha demostrado que el tratamiento con DETA/NO está asociado con una disminución en los niveles de glutatión intracelular (Clementi et al., 1998). El glutatión es, por una parte, el antioxidante mayoritario en la célula, además de representar la mayor fuente de grupos tioles no proteicos en el entorno fisiológico (Meister et al., 1983; Jones et al., 1983). Estos mismos autores demostraron que la adición de GSH a la preparación celular evitaba la inhibición de la cadena respiratoria causada por el estrés oxidativo, indicando que la oxidación de las proteínas de los complejos de la cadena de transporte electrónico era la responsable de la inhibición observada (Clementi et al., 1998).

Aun teniendo en cuenta lo anterior, la disminución de la actividad de la GCs por un tratamiento continuado con NO no se podría explicar por un mecanismo redox, ya que en las células sometidas a un tratamiento conjunto con DETA/NO y un derivado permeable del GSH la producción de GMPc inducida por un estímulo puntual fue de la misma magnitud que en las células tratadas con DETA/NO, y en ambos casos los niveles del nucleótido cíclico alcanzados fueron aproximadamente un 50% menores que los observados en las células control. Es más, la presencia del glutatión disminuyó ligeramente la producción de GMPc inducida por NO. Este efecto se puede deber a que parte del NO reacciona con el GSH existiendo por tanto menos NO para estimular a la GCs (Hogg et al., 1996). El GSH reacciona con NO rápidamente, formando GSNO. La formación de este compuesto podría representar un mecanismo fisiológico de regulación de la concentración de NO libre. Además, el GSNO puede descomponerse para liberar NO, lo cual podría ayudar a prolongar el tiempo de acción del NO. Algunas de las reacciones en las que participa el GSNO son las de transnitrosilación. Puesto que este compuesto es un nitrosotiol, la transferencia del grupo nitro a otros tioles, (como los presentes en los residuos de cisteína) está favorecida (Chiueh & Rauhala, 1999). Sin embargo, este mecanismo no parece estar implicado en la desensibilización de la GCs. De cualquier forma, las concentraciones de NO empleadas en este trabajo, mucho más bajas que las empleadas por otros autores, posiblemente no afecten de manera significativa a los niveles intracelulares de GSH, de ahí que la adición de éste no modifique los efectos producidos por NO. No obstante, el bloqueo de la síntesis de GSH da lugar a una potenciación del efecto inhibitor causado por el DETA/NO y provoca por sí mismo una desensibilización de la enzima. Esto revela que, efectivamente, una disminución



en la capacidad reductora intracelular puede estar implicada en la tolerancia a vasodilatadores.

Sin embargo, la tolerancia a nitrovasodilatadores no se puede explicar solamente como una alteración de la actividad de la GCs, ya que existen numerosas evidencias de variaciones importantes en los niveles de la enzima y por tanto de la capacidad de respuesta de las células a NO.

Algunos autores han propuesto que la modulación de los componentes de la ruta GCs/PKG I $\alpha$  puede ocurrir como uno de los eventos tempranos en el desarrollo de patógenesis relacionadas con la respuesta disminuida a NO como la hipertensión (Ruetten et al., 1999). Estos autores han descrito que el desarrollo de esta enfermedad está acompañada de una disminución en la expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs y en los niveles basales de GMPc presente. Aunque algunos estudios anteriores habían encontrado una elevada expresión de GCs en células cultivadas a partir de aorta de ratas hipertensas, estos resultados pueden deberse al número de pasaje de las células, así como a la edad de las ratas empleadas en el estudio (Papapetropoulos et al., 1994). De la misma forma, la exposición prenatal a elevadas concentraciones de aluminio también origina una disminución en la expresión de GCs, mecanismo que parece estar mediado por la activación de la vía GCs/PKG, dado que en este mismo estudio los efectos fueron emulados por SNAP (Llansola et al., 1999). El efecto contrario también se ha descrito en determinadas situaciones fisiológicas, esto, es la expresión de GCs aparece incrementada en los fallos cardíacos asociados con el secuestro de NO por parte de aniones superóxido en endotelio ó durante el embarazo (Bauersachs et al., 1999; Itoh et al., 1998). En estos estudios se aportan numerosas evidencias de la existencia de diferentes mecanismos de regulación de la expresión de la GCs.

Según los resultados presentados en este trabajo, el tratamiento continuado con NO se traduce en una menor expresión de los niveles de ARNm que codifica para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble. Además, se observa una disminución del nivel de la subunidad  $\beta_1$  de la proteína. Puesto que se necesita la formación del heterodímero para que la enzima sea activa, la disminución de una de las subunidades puede explicar la reducción de la actividad. El hecho de que se reduzcan los niveles de ARNm que codifican para las dos subunidades, pero que solamente se observe la reducción en la expresión de la subunidad  $\beta_1$ , se podría explicar por diferencias en la estabilidad de las dos subunidades de la proteína. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores que describen que en animales hipertensos o de edad avanzada, en los que la respuesta vasodilatadora está disminuida, la expresión de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs se encuentra suprimida (Bauersachs et al., 1997; Chen et al., 2000; Kloss et al., 2000). Otro dato que indica que la estabilidad de las dos subunidades pueda ser diferente es el hecho de que los niveles de sus ARNm son muy diferentes en células RFL-6, siendo mucho más abundante el que codifica para la subunidad  $\beta_1$  (Shimouchi et al., 1993). En nuestras

células, también parece que existe más cantidad del ARNm que codifica para la subunidad  $\beta_1$ , aunque las diferencias también podrían deberse a diferencias de eficiencia en la reacción de la polimerasa (PCR).

Por tanto, parece ser la subunidad  $\beta$  la más sensible a modulación. Esta idea viene apoyada por el hecho de que en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, los niveles de la subunidad  $\alpha_1$  se mantienen prácticamente invariables durante los tiempos estudiados (hasta 48 horas). Sin embargo, la subunidad  $\beta_1$  disminuye rápidamente, indicando que el recambio de esta subunidad es mucho más rápido. La disminución de la subunidad  $\beta_1$  fue todavía mayor cuando las células se incubaron conjuntamente en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas y NO, aunque los efectos de estos compuestos no fueron aditivos. Esto indicaría que el NO podría afectar a la biosíntesis de esta subunidad (tal y como hemos demostrado que sucede a nivel de la expresión de los ARNm) pero también a la velocidad de degradación de la subunidad  $\beta_1$ . El hecho de que en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas se mantenga el efecto del DETA/NO indica que en el mecanismo implicado no se requiere la síntesis de ninguna proteína. En células PC12, el NGF disminuye la expresión de los ARNm de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de GCs por un mecanismo que requiere la síntesis de un nuevo factor que desestabiliza el ARNm (Liu et al., 1997b). El valor de vida media calculado para la actividad GCs en presencia de la cicloheximida, coincidiría con un recambio largo como han propuesto otros autores (Liu et al., 1997b). Por otra parte, la vida media de la actividad enzimática se redujo significativamente en presencia de NO, sugiriendo que la presencia del NO desestabiliza a la enzima y la hace más vulnerable a una posible degradación proteolítica, efecto que se manifiesta principalmente sobre la subunidad  $\beta_1$ .

El mecanismo de la reducción de los niveles de guanilato ciclasa soluble como consecuencia del tratamiento prolongado con NO podría estar causado por una acción directa del NO, dada la elevada reactividad que presenta este radical. Por otro lado, también podría estar mediado por la activación de la ruta de segundos mensajeros. Para determinar los elementos implicados en este efecto, introdujimos en el medio el ODQ como inhibidor de la GCs, solo o en combinación con el NO. Este ensayo reveló que la inhibición de la GCs no era capaz de prevenir la disminución en la expresión de la enzima causada por NO. Además, en las células tratadas con ODQ solo se observó una disminución de la subunidad  $\beta_1$  de la enzima. Este hecho resultó bastante sorprendente y, aunque no se ha descrito con anterioridad ningún efecto similar, podría explicarse por el carácter oxidante del ODQ. El mecanismo propuesto para la inhibición de la GCs por ODQ se basa en su unión a la enzima provocando la oxidación del átomo de hierro del grupo hemo (Schrammel et al., 1996; Garthwaite et al., 1995). La presencia continuada del ODQ en el medio podría a su vez provocar la oxidación de algunos residuos de la proteína (como los grupos tioles de la subunidad  $\beta_1$  esenciales para la actividad de la GCs). Esta modificación podría desestabilizar a la enzima, modificando la interacción entre las subunidades, dando lugar a su separación y haciéndolas más vulnerables a un ataque proteolítico.

Sin embargo, la introducción de un inhibidor específico y selectivo de la PKG una hora antes de la incubación con NO fue capaz de prevenir parcialmente el efecto de éste sobre los niveles de la subunidad  $\beta_1$ , sugiriendo la participación de la vía GMPc/PKG en el proceso de regulación de los niveles de la GCs. Sin embargo, el tratamiento con un análogo permeable del GMPc que se comporta como activador de la PKG, no originó ningún efecto sobre los niveles de GCs, tanto solo como en combinación con ODQ o NO. Tampoco observamos ningún efecto en los niveles de GCs cuando las células se incubaron con el péptido natriurético tipo C (CNP), el cual incrementa los niveles de GMPc mediante la activación de una GC de membrana y produce la activación de la PKG (Rodríguez-Pascual et al., 1996). Aunque la falta de efecto del CNP podría explicarse por una desensibilización de su receptor como consecuencia de la presencia continuada de dicho compuesto (Potter & Garbers, 1994), el hecho de que la incubación con el activador de PKG tampoco se traduzca en una reducción de los niveles de la proteína (no hemos estudiado su efecto sobre los niveles de los ARNm), podría indicar que aunque la activación de la vía del GMPc/PKG condujese a una reducción de los niveles de ARNm, sólo se observaría una reducción de la proteína cuando en el medio exista un agente que incrementa su inestabilidad.

En vista de estos datos, es posible que en el efecto del NO estén coexistiendo dos mecanismos, uno que implicaría la oxidación por parte del NO bien del grupo hemo o de residuos específicos de la enzima, como han sugerido algunos autores (Papapetropoulos et al., 1996b) aumentando la inestabilidad de la subunidad  $\alpha_1$  específicamente, y el segundo que implicaría la activación de PKG y regulación de los niveles de ARNm.

Se han propuesto diferentes mecanismos implicados en la regulación de los niveles de la guanilato ciclasa soluble. Así, en células PC12 tratadas con NGF y en células del músculo liso de la arteria pulmonar tratadas con donadores de NO, la disminución de los niveles de los ARNm que codifican para ambas subunidades de la GCs se debe a que aumenta su inestabilidad. En este proceso participa la síntesis de alguna nueva proteína (Liu et al., 1997b; Filippov et al., 1997). El estudio del ARNm en animales hipertensos, que ya se ha visto que presentan una expresión de la GCs disminuida, también han revelado poseer una menor cantidad de ARNm para la subunidad  $\beta_1$  de la enzima (Gupta et al., 1997a; b). De la misma forma, en estudios en los que el tratamiento de 18 horas con donadores de NO provocan una disminución de la actividad de la GCs de hasta un 70%, se ha demostrado que estaba relacionado con una disminución del ARNm del 50 y 45 % para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima respectivamente (Ujiie et al., 1994). Estos resultados concuerdan con los presentados en nuestro trabajo, ya que la estimulación continuada con DETA/NO durante 16 horas producía una disminución de los ARNm que codifican para ambas subunidades de aproximadamente un 50%. Sin embargo, todavía desconocemos si esta reducción se debe a una menor síntesis de los mensajeros ó a una mayor degradación de los mismos.

La inhibición de la PKG con KT-5823 antes de la adición del NO previno el efecto causado por DETA/NO sobre el nivel de los ARNm de ambas subunidades, revelando que la PKG está implicada en el mecanismo de regulación. Además, al introducir como inhibidor de la PKG un análogo permeable del GMPc, el Rp-PET-cGMPS, a una concentración 100 veces superior al valor de la  $K_i$  descrita para este compuesto se abolió totalmente el efecto del DETA/NO sobre los niveles de los RNAm. Se ha descrito que este compuesto a mayores concentraciones (11  $\mu$ M) también puede inhibir a la PKA (Kase et al., 1987). Al incrementar la concentración de Rp-PET-cGMPS utilizada, hasta concentraciones a las que estábamos afectando ligera o completamente la actividad de PKA, su capacidad para prevenir la disminución de los RNAm causada por el NO fue menor. Sugiriendo que inhibición de la PKA afectaría de forma negativa a la expresión de la GCs, al menos en presencia de NO. Por otro lado la introducción de H-89 como inhibidor de PKA en presencia de DETA/NO a una concentración selectiva para ésta enzima, provocó una disminución muy significativa en los niveles de los ARNm para ambas subunidades de GCs. Estos resultados sugieren que la actividad de la PKA es necesaria para mantener los niveles de ARNm, mientras que la activación de PKG produce una modulación negativa de los mismos.

Sin embargo, los datos existentes en la bibliografía en los que se propone una actividad de PKA implicada en la regulación de la GCs, van en sentido contrario a los que nosotros proponemos. Diversos autores han mostrado que el tratamiento de células de músculo liso de aorta de rata con zaprinast (un inhibidor de la fosfodiesterasa tipo V), ó con IBMX (un inhibidor no específico de fosfodiesterasa) se traducía en una reducción de los niveles del RNAm que codifica para la subunidad  $\beta_1$ . Estos mismos autores, observaron que la estimulación de las células con forskolina o directamente la introducción de un análogo de AMPc producía el mismo efecto que la incubación con los inhibidores de fosfodiesterasas (Papapetropoulos et al., 1995; Shimouchi et al., 1993). Además, la inhibición de PKA por H-89 ó KT-5720 previno estos efectos (Papapetropoulos et al., 1996a;b). Sin embargo, las concentraciones utilizadas de estos inhibidores no garantizan una selectividad en su efecto, pudiendo afectar también a la PKG, ya que alcanzan concentraciones 60 veces superiores al valor  $K_i$  descrita para inhibir a la PKG, lo cual indica que el efecto que describen puede estar mediado por la inhibición de ésta y no de la PKA, ya que se existen numerosas evidencias de la activación cruzada de las quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos. Así, el GMPc puede activar a la PKA y el AMPc puede activar a la PKG (Torphy et al., 1982; Francis et al., 1988; Landgraf et al., 1986; Forte et al., 1992; Ruiz-Velasco et al., 1998; Van Riper et al., 1997). De cualquier forma, tampoco es sorprendente que existan mecanismos de regulación diferentes en diferentes tipos de células, y que en un mismo tipo coexistan diferentes mecanismos.

El hecho de que las variaciones en el ARNm vayan paralelas para ambas subunidades es comprensible dado que existe una colocalización de los genes que



**Efecto tóxico del YC-1 por tratamientos prolongados de las células**

Los resultados de este estudio demostraron que exposiciones prolongadas a YC-1 causan toxicidad en dos tipos de preparaciones celulares, endoteliales y cromafines de medula adrenal bovina, siendo este efecto independiente de la activación de la GCs.

El YC-1 fué capaz de incrementar los niveles de GMPc en ambos tipos celulares. Además, tal como ha sido descrito con anterioridad para otros tipos celulares, este compuesto presenta un efecto sinérgico con el NO (Friebe et al., 1998; Mülsch et al., 1997; Friebe & Koesling, 1997). En cualquier caso, la eficacia para incrementar los niveles de GMPc fue muy distinta en los dos tipos de preparaciones celulares. Los incrementos de GMPc registrados en células cromafines fueron muy superior a los obtenidos por estimulación de las células endoteliales a la respuesta celular obtenida. En las células endoteliales, el incremento no fue tan elevado y la magnitud de los niveles de GMPc alcanzados cuatro veces menor que la obtenida en células cromafines. Estos resultados pueden indicar una sensibilidad celular diferente a YC-1, pero también pueden revelar una expresión diferente de GCs, como se ha descrito para explicar la falta de efecto del YC-1 en cardiomiocitos aislados (Wegener et al., 1997).

En nuestro estudio se ha introducido el DEA/NO a la dosis que inducía el incremento máximo de los niveles de GMPc en los dos tipos celulares. Este agente donador de NO ha demostrado ser 16 veces más potente en células cromafines que en endoteliales, indicando que estas diferencias podrían ser atribuidas a la existencia de diferentes niveles de GCs en los dos tipos celulares o una diferente actividad de la enzima. En cualquier caso, otros factores como la mayor producción de especies reactivas de oxígeno en células confluentes endoteliales (Moldovan et al., 2000), las cuales inhiben la activación de GCs bien por NO o por el YC-1 (Mülsch et al., 1997; Davis et al., 1997), también pueden explicar las diferencias entre los incrementos de GMPc inducidos por estimulación en los dos tipos celulares.

Dado que se ha descrito la falta de efecto del ODQ para inhibir la GCs en cardiomiocitos ventriculares de rata (Wegener et al., 1999), probamos la capacidad de prevenir los incrementos de GMPc inducidos por el YC-1 tanto en células cromafines como endoteliales, encontrándose un efecto inhibitorio comparable entre ellas.

Como ya se ha dicho, el objetivo de nuestro trabajo era el mecanismo de regulación de la vía del GMPc a largo plazo. Por ello se pretendió utilizar el YC-1 como compuesto activador de la GCs de forma independiente de NO. Este compuesto además ha emergido en los últimos años como la gran esperanza de los tratamientos cardiovasculares con agentes vasodilatadores, debido, entre otros motivos, a la capacidad que ha demostrado de potenciar la acción del NO. Sin embargo, hasta el momento, se han llevado a cabo muy pocos estudios sobre el efecto de incubaciones prolongadas con YC-1.

El principal descubrimiento obtenido fue la identificación de un nuevo efecto del YC-1, que parece ser mediado por un mecanismo independiente de su capacidad para incrementar el GMPc. La exposición prolongada de las células cromafines y endoteliales a YC-1 indujo citotoxicidad en las células. El tratamiento con YC-1 durante 48 ó 24 horas, indujo desorganización del citoesqueleto y cambios de morfología celular. Las células se redondeaban y perdían adhesión a las superficies de cultivo, con la consecuente pérdida de células. Además, aquellas que permanecían adheridas, también mostraron signos de toxicidad celular.

Al someter a las células a tratamientos más cortos, de 16 horas, hemos observado la aparición de fragmentación del DNA, indicando que la muerte celular era debida, al menos en parte, a un proceso apoptótico. Taimor et al (Taimor et al., 2000) han demostrado que el YC-1 induce apoptosis en cardiomiocitos mediante un mecanismo dependiente de GMPc. Sin embargo, diversas líneas de evidencia demuestran que en este caso los efectos observados son independientes de la producción de GMPc. En primer lugar, aunque el ODQ fue capaz de inhibir de manera efectiva los incrementos de GMPc inducidos por YC-1, no fue capaz de prevenir la apoptosis y sus alteraciones asociadas. En segundo lugar, el YC-1 fue capaz de inducir apoptosis a concentraciones a las que apenas si producían incrementos en la actividad de GCs. Es más, en los casos en que se introdujo ODQ junto con el YC-1, la presencia del primero parecía potenciar el efecto tóxico del YC-1, indicando que podría existir un mecanismo dependiente de GMPc que ejerciera un efecto protector. Los datos presentados en la medida de actividad de caspasas conjuntamente con la fragmentación del ADN nuclear, son pruebas inequívocas de la existencia de un proceso apoptótico desencadenado por tratamiento con YC-1. Además, estos efectos tampoco fueron prevenidos por la inhibición de guanilato ciclasa soluble. Estos resultados se correlacionan bien con descubrimientos anteriores en los que se encontró un mecanismo protector de la apoptosis dependiente de GMPc en diferentes tipos celulares (Genaro et al., 1995; Kim et al., 1997). Aunque el mecanismo molecular por el cual el GMPc suprime la señal apoptótica aun no ha sido determinado, podría implicar la activación de la PKG (Rodríguez-Pascual et al., 1996; Rodríguez-Pascual et al., 1999), la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Rodríguez-Pascual et al., 1995; Cornwell et al., 1989) y la inhibición de la actividad de caspasas (Genaro et al., 1995; Kim et al., 1997; Kim et al., 1999).

Algunos de los estudios en que se introducía el YC-1 en tratamientos largos, han descrito un efecto antiproliferativo en células A10 de músculo liso vascular por Yu et al (Yu et al., 1995), pero en este estudio los autores no detectaron toxicidad y además los efectos antiproliferativos descritos eran dependientes de los incrementos en los niveles de GMPc. Los efectos del YC-1 sobre células cromafines y endoteliales no se pueden explicar de esta manera, ya que las primeras no proliferan, y aunque las células endoteliales si lo hacen, los experimentos en este caso se realizaron con células confluentes, lo cual garantiza que las células se encontraban en estado quiescente. Puede ser que el YC-1 tuviera los dos efectos en células endoteliales,

porque la reducción en el número de células fue mayor cuando el YC-1 se añadió a células preconfluentes, pero, como se ha visto en los resultados, este efecto fue independiente de la síntesis de GMPc.

Las alteraciones en la morfología celular están relacionadas con la modificación del citoesqueleto y la adhesión celular (Ingber et al., 1993). Existen varias observaciones indicando que el NO afecta tanto a la migración como a la proliferación de diferentes tipos celulares (Hassid et al., 1999; Brown et al., 1999). En células de músculo liso de ahorta, el NO altera la adhesión celular y la motilidad a través de la vía de señalización del GMPc por activación de una proteína tirosina fosfatasa 1B (Hassid et al., 1999). En cualquier caso, hemos observado una desorganización del citoesqueleto de actina inducida por YC-1 que podría ser explicado por estos mecanismos porque, como se ha dicho anteriormente, los efectos observados fueron independientes de GMPc.

Los resultados muestran que aunque el YC-1 es un buen activador de GCs, este compuesto tiene otros efectos que son dependientes de la activación de GCs y pueden representar una señal de inducción de muerte celular.





Las conclusiones de este trabajo de investigación son:

1.- Existen grandes diferencias entre los distintos donadores de NO estudiados, tanto en cuanto a la velocidad de liberación de NO como a la cantidad del mismo producido.

-Existe una buena correlación entre la producción de NO y su capacidad para activar a la guanilato ciclasa soluble en el caso de los NONOatos, DEA/NO y SPER/NO.

-La velocidad de descomposición del SNAP es muy lenta en nuestras condiciones experimentales y se incrementa notablemente por la presencia de glutatión en el medio.

-En el análisis de la capacidad del SNAP de estimular la producción de GMPc se observa un comportamiento bifásico. Observamos una inhibición de la guanilato ciclasa soluble a elevadas concentraciones de SNAP.

- Las concentraciones efectivas de cada donador de NO van a venir determinadas por su naturaleza química o por la composición del medio. Por tanto siempre será necesaria la determinación de la concentración de NO en cada sistema para asegurarse del empleo de concentraciones fisiológicas.

2.- La guanilato ciclasa soluble está sujeta a un mecanismo de regulación por fosforilación/defosforilación.

- La subunidad  $\beta$  de la guanilato ciclasa soluble se encuentra fosforilada en condiciones basales. El grado de fosforilación disminuye tras una estimulación de la vía GMPc/PKG.

- La defosforilación de la enzima conlleva una inhibición de la misma, aunque no se afecta a la afinidad por el NO.

- El mecanismo de regulación propuesto es que la proteína quinasa G activa una proteína fosfatasa, previsiblemente una PP2A, y ésta defosforila e inactiva la guanilato ciclasa soluble.

3.- El tratamiento prolongado con NO produce una disminución de la actividad guanilato ciclasa soluble.

- Aunque el tratamiento con NO se traduce en una reducción de los niveles de los ARNm que codifican para las dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), sólo se observa una reducción del nivel de la subunidad  $\beta$ , indicando que la subunidad  $\alpha$  es mucho más estable, y que el reciclamiento de la subunidad  $\beta$  es más rápido.

-El mecanismo de regulación de los niveles de los ARNm que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  por NO es común para ambas, sugiriendo pueda existir una regulación coordinada de ambos genes.

-La desestabilización de la subunidad  $\beta_1$  puede deberse a la oxidación de diferentes grupos de la proteína y que esta modificación la haga más vulnerable a la proteólisis. Ya que la presencia de agentes oxidantes reduce significativamente la vida media de la proteína.

4.- El activador de la guanilato ciclasa soluble, YC-1, es tóxico para las células.

- El efecto citotóxico no se debe a la capacidad del YC-1 de estimular a la GCs.

- El tratamiento con YC-1 desencadena un proceso apoptótico. Se ha podido determinar activación de caspasa 3, fragmentación de ADN nuclear, cambios morfológicos acompañados de alteraciones en el citoesqueleto y disminución de la viabilidad y funcionalidad celulares.

- Estos efectos ponen en entredicho su posible uso terapéutico en enfermedades cardiovasculares.

- Ahlner, J., Andesson, R.G.G., Torfgard, K. and Alexon, K.L. (1991) Organic nitrates esters: clinical use and mechanisms of action. *Pharmacol.Rev.*, **43**, 351-423.
- Akamatsu, N., Inenaga, K. and Yamashita, H. (1993) Inhibitory effects of natriuretic peptides on vasopressin neurons mediated through cGMP-dependent protein kinase *in vitro*. *Neuroendocrinol.*, **5**, 517-522.
- Albillos, A., Gandía, L., Michelena, P., Gilabert, J.A., Del Valle, M., Carbone, E. and García, A.G. (1996) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.*, **494**, 687-695.
- Alioua, A., Tanaka, Y., Hofmann, M., Ruth, P., Meera, P. and Toro, L. (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, HSLO, is a target of cGMP dependent protein kinase phosphorylation *in vivo*. *J.Biol.Chem.*, **273**, 32950-32956.
- Anderson, K., Robinson, P.J. and Marley, P.D. (1992) Cholinergic regulation of cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *Br.J.Pharmacol.*, **106**, 360-366.
- Aparicio, J.G. and Applebury, M.L. (1996) The photoreceptor guanylate cyclase is an autophosphorylating protein kinase. *J.Biol.Chem.*, **271**, 27083-27089.
- Arancio, O., Kandel, E.R. and Hawkins, R.D. (1995) Activity-dependent long term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*, **376**, 74-80.
- Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H. (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am.J.Pathol.*, **136**, 593-608.
- Ariano, M.A. (1983) Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience*, **10**, 707-723.
- Artalejo, A.R. (1995) Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En *The electrophysiology of neuroendocrine cells*. (Scherübl H.y Hescheler J.eds.), CRC Press, 259-299.
- Artalejo, C.R., Adams, M.E. and Fox, A.P. (1994) Three types of Ca<sup>2+</sup> channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature*, **367**, 72-76.
- Aunis, D., Pescheloché, M. and Zwiller, J. (1978) Guanylate cyclase from bovine adrenal medulla: subcellular distribution and studies on the effect of lysolecithin on enzyme activity. *Neuroscience*, **3**, 83-93.
- Baltrons, M.A. and García, A. (1999) Nitric Oxide-independent down-regulation of soluble guanylyl cyclase by bacterial endotoxin in astroglial cells. *J.Neurochem.*, **73**, 2149-2157.

- Banerjee, D.K., Youdim, M.B.H., Heldman, E. and Pollard, H.B. (1985) Endothelial cells from bovine adrenal medulla develop capillary-like growth patterns in culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **82**, 4702-4706.
- Barry, M.A. and Eastman, A. (1993) Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch.Biochem.Biohpys.*, **300**, 440-450.
- Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R. and Harrison, D.G. (1991) Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem.Pharmacol.*, **42(suppl.)**, S157-S165
- Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R. and Harrison, D.G. (1992) Chemical release of nitric oxide from sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **262**, 916-922.
- Bauersachs, J., Bouloumie, A., Franccarollo, D., Hu, K., Busse, R. and Ertl, G. (1999) Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*, **100**, 292-298.
- Bauersachs, J., Bouloumie, A., Mülsch, A., Wiemer, G., Fleming, I. and Busse, R. (2001) Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: change in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc.Res.*, **37**, 772-779.
- Beall, A.C., Goldenring, J.R., Rasmunssen, H. and Brophy, C.M. (1997) Cyclic nucleotide-dependent vasorelaxation is associated with the phosphorylation of a small heat shock-related protein. *J.Biol.Chem.*, **272**, 11283-11287.
- Beavo, J.A. and Reifsnyder, D.H. (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends in Pharmacol.Sci.*, **11**, 150-155.
- Becker, E., Wunder, F., Kast, R., Robyr, C., Hoenicka, M., Gerzer, R. and Stasch, J. (1999) Generation and characterization of a stable soluble guanylate cyclase-overexpressing CHO cells. *Nitric oxide*, **3**, 55-66.
- Becker, E.M., Schmidt, P., Schramm, M., Schröder, H., Walter, W., Gerzer, R. and Stasch, J.-P. (2000) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): target of YC-1 and nitric oxide effects in human and rat platelets. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **35**, 390-397.
- Becker, K., Gui, M. and Schirmer, R.H. (1995) Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur.J.Biochem.*, **234**, 472-478.

- Behrends, S., Harteneck, C., Schultz, G. and Koesling, D. (1995) A variant of the  $\alpha_2$  subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J.Biol.Chem.*, **270**, 21100-21113.
- Behrends, S., Kazmierczak, B., Steinpass, A., Knauf, B., Bullendick, J., Scholz, H. and Eiberg, H. (1999) Assignment of GUCY1B2, the gene coding for hte  $\alpha_2$  subunit of human guanylyl cyclase to chromosomal band 13q14.3 between markers D13S168 and D13S155. *Genomics*, **55**, 126-127.
- Behrends, S., Steenpass, A., Porst, H. and Scholz, H. (2000) Expression of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase subunits in human corpus cavernosum. *Biochem.Pharmacol.*, **59**, 713-717.
- Bellamy, T.C., Wood, J., Goodwin, D.A. and Garthwaite, J. (2000) Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 2928-2933.
- Biales, B., Dichter, M.A. and Tischler, A. (1976) Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J.Physiol.*, **262**, 743-753.
- Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A. and Hofmann, F. (1999) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev.Physiol.Biochm.Pharmacol.*, **135**, 151-171.
- Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E. and Hofmann, F. (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 7553-7557.
- Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Curran, R.D., Langrehr, J.M. and Simmons, R.L. (1992) A role for inducible nitric oxide biosynthesis in the liver in inflammation and in the allogeneic immune response. *J.Lab.Clin.Med.*, **120**, 192-197.
- Bloch, K., Filippov, G., Sanchez, L., Nakane, M. and De la Monte, S. (1997) Pulmonary soluble guanylyl cyclase, a nitric oxide receptor, is increased during the perinatal period. *Am.J.Physiol.*, **272**, L400-L406
- Boxal, A. R. and Garthwaite, J. (1996) Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eur.J.Neuroscience* **8**, 2209-2212.. Brandes, R.P., Kim, D., Schmitz-Winnenthal, F.H., Amidi, M.,
- Godecke, A., Mulsch, A. and Busse, R. (2000) Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*, **35**, 231-236.

- Brandt, B.L., Hagiwara, S., Kidakoro, Y. and Miyazaki, S. (1976) Action potentials in the rat chromaffin cells and effects of acetylcholine. *J.Physiol.*, **263**, 417-439.
- Brandwein, H.J., Lewicki, J.A. and Murad, F. (1981) Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulphide formation. *J.Biol.Chem.*, **256**, 2958-2962.
- Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M. and Snyder S.H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localised in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, **7**, 615-624.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requirig enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 682-685.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, **347**, 768-770.
- Bredt, D.S., Ferris, C.D. and Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J.Biol.Chem.*, **267**, 10976-10981.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu.Rev.Biochem.*, **63**, 175-195.
- Brilli, R.J., Krafte-Jacobs, B., Smith, D.J., Roselle, D., Passerini, D., Vromen, A., Szabo, C. and Salzman, A.L. (1997) Intratracheal instillation of a novel NO/nucleophite adduct selectively reduces pulmonary hypertension. *J.Appl.Physiol.*, **83**, 1968-1975.
- Brown, C., Pan, X. and Hassid, A. (1999) Nitric oxide and C-type atrial natriuretic peptide stimulate primary aortic smooth muscle cell migration via a cGMP-dependent mechanism: relationship to microfilament dissociation and altered cell morphology. *Circ.Res.*, **84**, 655-667.
- Bruhwyler, J., Chleide, E., Liegeois, J.F. and Carreer, F. (1993) Nitric oxide: a new messenger in the brain. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, **17**, 373-378.
- Brune, B., Dimmeler, S., Molina-y-Vedia, L. and Lapetina, E.G. (1994) Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sciences*, **54**, 61-70.
- Brune, B., Sandau, K. and von Knethen, A. (1998) Apoptotic cell death and nitric oxide: activating and antagonistic transducing pathways. *Biochemistry (Mosc)*, **63**, 817-825.

- Brunner, F., Stessel, H. and Kukovetz, W.R. (1995) Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Letters*, **376**, 262-266.
- Brunner, F., Schmidt, K., Nielsen, E.B. and Mayer, B. (1996) Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **277**, 48-53.
- Buechler, W.A., Nakane, M. and Murad, F. (1991) Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **174**, 351-357.
- Burgoyne, R.D. (1991) Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Bioch.et Bioph.Acta*, **1071**, 174-202.
- Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1993) Regulated exocytosis. *Biochem.J.*, **293**, 305-316.
- Butler, A.R. and Glidewell, C. (1987) Recent chemical studies of sodium nitroprusside relevant to its hypotensive action. *Chem.Soc.Rev.*, **16**, 361-380.
- Butt, E., Geiger, J., Jarchau, T., Lohmann, S.M. and Walter, U. (1993) The cGMP-dependent protein kinase-gene, protein and function. *Neurochem.Res.*, **18**, 27-42.
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. and Walter, U. (1994) cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14509-14517.
- Buttery, L.D., Springall, D.R., Riveros-Moreno, V., Hart, I., Piper, P.J. and Polak, J.M. (1993) Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumours in mice. *J.Pathol.*, **171**, 311-319.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Sancesario, G., Morello, M., Giorgi, M., Pisani, A., and Bernardi, G. A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *The Journal of Neuroscience* 19(7), 2489-2499. 1999. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Callewaert, G., Johnson, R.G. and Morad, M. (1991) Regulation of the secretory response in bovine chromaffin cells. *Am.J.Physiol.*, **260**, C851-C860
- Calvo, S., Granja, R., González-García, C. and Ceña, V. (1995) Catecholamine secretion, calcium levels and calcium influx in response to membrane depolarization in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **68**, 265-272.



- Casadó, V., Casillas, T., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1992) The adenosine receptors present on the plasma membrane of chromaffin cells are of the A2b subtype. *J.Neurochem.*, **59**, 425-431.
- Charbonneau, H., Prusti, R.K., LeTrong, H., Sonnenburg, W.K., Mullaney, P.J., Walsh, K.A. and Beavo, J.A. (1990) Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87**, 288-292.
- Chen, C. and Schofield, G.G. (1993) Nitric oxide modulates  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in rat sympathetic neurons. *Eur.J.Pharmacol.*, **243**, 83-86.
- Chen, F. and Wagner, P.D. (1997) Pertussis toxin modification of PC12 cells lowers cytoskeletal F-actin and protein phosphatases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **105**, 317-328.
- Chen, F., Vu, N.D. and Wagner, P.D. (1998) Pertussis toxin modification of PC12 cells inhibits a protein phosphatase 2A-like phosphatase. *J.Neurochem.*, **71**, 248-257.
- Chen, L., Daum, G., Fischer, J., Hawkins, S., Bochanton-Piallat, M.L., Gabiani, G. and Clowes, A.W. (2000) Loss of expression of the beta subunit of soluble guanylyl cyclase prevents nitric oxide-mediated inhibition of DNA synthesis in smooth muscle cells of old rats. *Circ.Res.*, **86**, 520-525.
- Chhajlani, V., Frandberg, P.A., Ahlner, J., Axelsson, K. and Wikberg, J. (1991) Heterogeneity in human soluble guanylate cyclase due to alternative splicing. *FEBS*, **290**, 157-158.
- Chinkers, M., Garbers, D., Chang, M.S., Lowe, D.G., Chin, H., Goeddel, D. and Schulz, S. (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, **338**, 78-83.
- Chinnaiyan, A.M. and Dixit, V.M. (1996) The cell-death machine. *Curr.Biol.*, **6**, 555-562.
- Chirkov, Y.Y., Holmes, A.S., Chirkova, L.P. and Horowitz, J. (1999) Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation*, **100**, 129-134.
- Chiueh, C.C. and Rauhala, P. (1999) The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Rad.Res.*, **31**, 641-650.
- Chrisman, T.D., Garbers, D.L., Parks, M.A. and Hardman, J.G. (1975) Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J.Biol.Chem.*, **250**, 374-378.

- Chrisman, T.D. and Garbers, D.L. (1999) Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, **274**, 4293-4299.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. and Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 7631-7636.
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D. and Skilleter, D.N. (1992) Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem.J.*, **286**, 331-334.
- Collier, J. and Vallance, P. (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends in Pharmacol.Sci.*, **10**, 427-431.
- Collins, R.J., Harmon, B.V., Gobe, G.C. and Kerr, J.F. (1992) Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int.J.Radiat.Biol.*, **61**, 451-453.
- Compton, M.M. (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer.Metastasis.Rev.*, **11**, 105-119.
- Cornwell, T.L. and Lincoln, T.M. (1989) Regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in cultured smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.*, **264**, 1146-1155.
- Coupland, R.E. (1965) Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. II. Normal innervation. *J.Anat.*, **99**, 231-272.
- Coupland, R.E. and Selby, J.E. (1976) The blood of the mammalian adrenal medulla: a comparative study. *J.Anat.*, **122**, 539-551.
- Crawley, D.E., Zhao, L., Giembycz, M.A., Liu, S., Barnes, P.J., Winter, R.J. and Evans, T.W. (1992) Chronic hypoxia impairs soluble guanylyl cyclase-mediated pulmonary arterial relaxation in the rat. *Am.J.Physiol.*, **263**, 325-332.
- Criado, M., Alamo, L. and Navarro, A. (1992) Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem.Res.*, **17**, 281-287.
- Crouch, M.F. and Simson, L. (1994) The GTP-binding protein Gi alpha 2 is directly linked to and substrate of a serine kinase in Balb/c3T3 cells. *Cell Signal*, **6**, 706
- Currie, K.P.M. and Fox, A.P. (1996) ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, **16**, 1027-1036.

- Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L. and Smith, C.E. (1992) Guanilyn: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 947-951.
- Davis, J.P., Vo, X.T. and Sulaklhe, P.V. (1997) Altered responsiveness of guanylyl cyclase to nitric oxide following treatment of cardiomyocytes with S-nitroso-D,L-acetyl penicillamine and sodium nitroprusside. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **238**, 351-356.
- Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M. and Snyder, S.H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **88**, 7797-7801.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R. and Snyder, S.H. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J.Neurosci.*, **13**, 2651-2661.
- Deinum, G., Stone, J.R., Babcock, G.T. and Marletta, M.A. (1996) Binding of nitric oxide and carbon monoxide to soluble guanylate cyclase as observed with Resonance raman spectroscopy. *Biochemistry*, **35**, 1540-1547.
- Deng, A. and Rapp, J. (1995) Locus for the inducible, but not a constitutive, nitric oxide synthase cosegregates with blood pressure in the Dahl salt sensitive rats. *J.Clin.Invest.*, **95**, 2170-2179.
- Denninger, J.W. and Marletta, M.A. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Bioch.et Bioph.Acta*, **1411**, 334-350.
- Denninger, J. W., Schelvis, J. P. M., Brandish, P. E., Zhao, Y., Babcock, G. T., and Marletta, M. A. Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry* 39, 4191-4198. 2000. (GENERIC) Ref Type: Journal (Full)
- Desai, K.M., Sessa, W.C. and Vane, J.R. (1991) Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accomodate food of fluid. *Nature*, **351**, 477-479.
- Desole, M.S., Kim, W.K., Rabin, R.A. and Layhcock, S.C. (1994) Nitric oxide reduces depolarization-induced calcium influx in PC12 cells by a cyclic GMP-mediated mechanism. *Neuropharmacology*, **33**, 193-198.
- Dessauer, C.W. and Gilman, A.G. (1997) The catalytic mechanism of mammalian adenylyl cyclase. Equilibrium binding and kinetic analysis of P-site inhibition. *J.Biol.Chem.*, **272**, 27787-27795.
- Dicks, A.P., Swift, H.R., Willianms, D.L.H., Butler, A.R., Alsa'doni, H.H. and Cox, B.G. (1996) Identification of Cu<sup>+</sup> as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J.Chem.Soc.Prekin Trans.*, **2**, 481-487.

- Dierks, E.A. and Burstyn, J.N. (1998) The deactivation of soluble guanylyl cyclase by redox-active agents. *Arch.Bioche.Biophys.*, **351**, 1-7.
- Dills, W.L.J., Beavo, J.A., Bechtel, P.J., Myers, K.R., Sakai, L.J. and Krebs, E.G. (1976) Binding of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase regulatory subunit to immobilized cyclic nucleotide derivatives. *Biochemistry*, **15**, 3724-3731.
- Dinerman, J.L., Steiner, J.P., Dawson, T.M., Dawson, V. and Snyder, S.H. (1994) Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology*, **33**, 1245-1251.
- Dohi, T., Morita, K. and Tsujimoto, A. (1983) Effect of sodium azide on catecholamine release from isolated adrenal gland and on guanylate cyclase. *Eur.J.Pharmacol.*, **94**, 331-335.
- Douglas, W.W., Kanno, T. and Sampson, S.R. (1976) Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J.Physiol.*, **188**, 107-120.
- Douglas, W.W., Kanno, T. and Sampson, S.R. (1976) Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J.Physiol.*, **191**, 107-121.
- Downs, T.R. and Wilfinger, W.W. (1983) Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal.Biochem.*, **131**, 538-547.
- Drago, R.S. and Paulik, F.E. (1960) The reaction of nitrogen (II)oxide with diethylamine. *J.Amer.Chem.Soc.*, **82**, 96-98.
- Du, Z.Y., Hicks, M., Hansz, P., Rainer, S., Spratt, P. and Macdonald, P. (1998) The nitric oxide donor, diethylamine NONOate, enhances preservation of the donor rat heart. *J.Heart Lung Transplant*, **17**, 1113-1120.
- Duhe, R.J., Neilsen, M.D., Dittman, A.H., Villacres, E.C., Choi, E.J. and Storm, J.R. (1994) Oxidation of critical cysteine residues of type I adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmoduline. *J.Biol.Chem.*, **269**, 7290-7296.
- Dun, N.J., Dun, S.L., Forstermann, U. and Tseng, L.F. (1992) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neuroscience Lett.*, **147**, 217-220.
- Dun, N.J., Dun, S.L., Wu, S.Y. and Forstermann, U. (1993) Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neuroscience Lett.*, **158**, 51-54.

- Dunlap, K., Luebke, J.I. and Turner, T.J. (1995) Exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.*, **18**, 89-98.
- Eich, R.F., Li, T., Lemon, D.D., Doherty, D.H., Curry, S.R., Aitken, J.F., Mathews, A.J., Johnson, K.A., Phillips, G.N.J. and Olson, J.S. (1996) Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, **35**, 6976-6983.
- Ekerhovd, E., Brannstrom, M., Delbro, D. and Norstrom, A. (1998) Nitric oxide-mediated inhibition of contractile activity in the human uterine cervix. *Mol.Hum.Reprod.*, **4**, 915-920.
- El-Husseini, A.E., Bladen, C., Williams, J.A., Reiner, P.B. and Vincent, S.R. (1998) Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in brain. *J.Neurochem.*, **71**, 676-683.
- Ellis, R.E., Yuan, J. and Horovitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev.Cell.Biol.*, **7**, 663-698.
- Elworthy, P.M. (1986) An improved method for the fluorometric determination of tissue catecholamines. *Neurochem.Res.*, **11**, 753-758.
- Enan, E. and Matsumura, F. (1992) Specific inhibition of calcineurine by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochem.Pharmacol.*, **43**, 1777-1784.
- Eränko, O. (1952) On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat.*, **16**, 1-60.
- Eränko, O. (1955) Distribution of fluorescing islets, adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla of the hamster. *Acta Endocrinol.(Copenh.)*, **18**, 174-179.
- Evans, T., Carpenter, A. and Cohen, J. (1992) Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 5361-5365.
- Fan, B., Gupta, G., Danziger, R.S., Friedman, J.M. and Rousseau, D.L. (1998) Resonance Raman characterization of soluble guanylate cyclase expressed from baculovirus. *Biochemistry*, **37**, 1178-1184.
- Febel, J., Trockur, B., Ecker, T., Landgraf, W. and Hofmann, F. (1988) Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in fresh isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J.Biol.Chem.*, **263**, 16764-16771.
- Feelisch and M. (1991) The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparations and handling of aqueous NO solutions. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **17**, S25-S33

- Feldberg W., Minz B. and Tsudzimura H (1934) The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J.Physiol.*, **81**, 286-304.
- Fenrik, R., McNicoll, N. and De Léan, A. (1996) Glycosilation is critical for natriuretic peptide receptor-B function. *Mol.Cell Biochem.*, **165**, 103-109.
- Field, M., Graf, L.H., Laird, W.J. and Smith, P.L. (1978) Heat stable enterotoxin *Escherichia coli*: *In vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP accumulation, and ion transport in small intestine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **75**, 2800-2804.
- Filippov, G., Bloch, D.B. and Bloch, K.D. (1997) Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.*, **100**, 942-948.
- Foerster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G. and Koesling, D. (1996) A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  subunits. *Eur.J.Biochem.*, **240**, 380-386.
- Folkow, B. and von Euler, U.S. (1954) Selective activation of noradrenaline and adrenaline producing cells in the cat's adrenal gland by hypothalamic stimulation. *Circ.Res.*, **2**, 191-195.
- Forte, L.R., Thorne, P.K., Eber, S.L., Krause, W.J., Freeman, R.H., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1992) Stimulation of intestinal  $\text{Cl}^-$  transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am.J.Physiol.*, **263**, C607-C615
- Forte, L.R. (1999) Guanylin regulatory peptides: Structures, biological activities mediated by cyclic Gmp and photobiology. *Regul.Pept.*, **81**, 25-39.
- Forte, L.R., Eber, S.L., Fan, X., London, R.M., Wang, Y., Rowland, L.M., Chin, D.T., Freeman, R.H. and Krause, W.J. (1999) Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology*, **140**, 1800-1806.
- Foster, D., Wedel, B., Robinson, S. and Garbers, D. (1999) Mechanims of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev.Physiol.Biochm.Pharmacol.*, **135**, 1-41.
- Förstermann, U., Pollock, J.S., Schmidt, H.H.W., Heller, M. and Murad, F. (1991) Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/ nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **88**, 1788-1792.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P. and Kleinert, H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, **23**, 1121-1131.

- Förstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E.I. and Kleinert, H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem.Pharmacol.*, **50**, 1312-1332.
- Francis, S.F. and Corbin, J.D. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu.Rev.Physiol.*, **56**, 237-272.
- Francis, S.F. and Corbin, J.D. (1994) Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv.Pharmacol.*, **26**, 115-170.
- Francis, S.H., Lincoln, T.M. and Corbin, J.D. (1980) Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J.Biol.Chem.*, **255**, 620-626.
- Francis, S.H., Noblett, B.D., Todd, B.W., Wells, J.N. and Corbin, J.D. (1988) Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol.Pharmacol.*, **34**, 506-517.
- Friebe, A., Schultz, G., and Koesling, D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO Journal* 15(24), 6863-6868. 1996. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Friebe, A., Wedel, B., Foerster, J., Harteneck, C., Malkewtiz, J. and Koesling, D. (1997) Function of conserved cysteine residues on soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, **36**, 1194-1198.
- Friebe, A. and Koesling, D. (1998) Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Molecular Pharmacology*, **53**, 123-127.
- Friebe, A., Müllershausen, F., Smolenski, A., Walter, U., Schultz, G., and Koesling, D. YC-1 potentiates nitric oxide and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Molecular Pharmacology* 54, 962-967. 1998. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Friebe, A., Russwurm, M., Mergia, E., and Koesling, D. A point mutated guanylyl cyclase with features of the YC-1-stimulated enzyme: implications for the YC-1 binding site? *Biochemistry* 38, 15253-15257. 1999. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Furchgott and R.F.Zawadzski, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
- Furchgott, R.F. and Vanhoutte, P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, **3**, 2007-2018.

- Furukawa, K., Barger, S.W., Blalock, E.M. and Mattson, M.P. (1996) Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature*, **379**, 74-78.
- Fülle, H.J., Vassar, R., Foster, D.C., Yang, R.B., Axel, R. and Garbers, D.L. (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **92**, 3571-3575.
- Galle, J., Zabel, U., Hübner, U., Hatzelmann, A., Wagner, B., Wanner, C, and Schmidt, H. H. H. W. Effects of the soluble guanylyl cyclase activator YC-1 on vascular tone, Cyclic GMP levels and phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology* 127, 195-203. 1999. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Gambaryan, S., Häusler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurt, A. and Lohmann, S.M. (1996) Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlation with renin gene expression. *J.Clin.Invest.*, **98**, 662-670.
- Gamm, D.M., Francis, S.H., Angelotti, T.P., Corbin, J.D. and Uhler, M.D. (1995) The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J.Biol.Chem.*, **270**, 27380-27388.
- Garbers, D.L. and Gray, J.P. (1974) Guanylate cyclase from sperm of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Methods.Enzymol.*, **38**, 196-199.
- Garbers, D.L. (1979) Purification of soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Biol.Chem.*, **254**, 240-243.
- García-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J. and Sessa, W.C. (1996) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J.Biol.Chem.*, **271**, 27237-27240.
- Garg, U.C. and Hassid, A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-Br-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, **83**, 1774-1777.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K. and Mayer, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol.Pharmacol.*, **48**, 184-188.
- Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S.O. and Walter, U. (1992) Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 1031-1035.



- Genaro, A.M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martínez, C. and Boscá, L. (1995) Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J.Clin.Invest.*, **95**, 1884-1890.
- Gerzer, R., Bohme, E., Hofmann, F. and Schultz, G. (1981) Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Letters*, **132**, 71-74.
- Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. and Kanstein, C.B. (1976) Purification and characterization of 3':5'-cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **73**, 3918-3922.
- Goldstein, S. and Czapski, G. (1995) Kinetics of nitric oxide autooxidation in aqueous solution in the absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates. *J.Am.Chem.Soc.*, **117**, 12078-12084.
- Goligorsky, M.S., Tsukahara, H., Magazine, H., Andersen, T.T., Malik, A.B. and Bahou, W.F. (1994) Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J.Cell Physiol.*, **158**, 485-494.
- Golstein, P. (1997) Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr.Biol.*, **7**, R750-R753
- Gopalakrishna, R., Chen, A.H. and Gundimeda, U. (1993) Nitric oxide and nitric oxide generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J.Cell Physiol.*, **158**, 458-494.
- Gordge, M.P., Meyer, D.J., Hothershall, J., Neild, G.H., Payne, N.N. and Noronha-Dutra, A. (1996) Role of a copper (I)-dependent enzyme in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br.J.Pharmacol.*, **114**, 1083-1089.
- Graier, W.F., Sturek, M. and Kukovetz, W.R. (1994)  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and endothelial vascular function. *Endothelium*, **1**, 223-236.
- Grider, J.R. and Jin, J.G. (1993) Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience*, **54**, 521-526.
- Griscavage, J.M., Fukuto, J.M., Komori, Y. and Ignarro, L.J. (1994) Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. *J.Biol.Chem.*, **269**, 21644-21649.
- Gryglewski, R.J., Moncada, S. and Palmer, R.M.J. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of EDRF. *Nature*, **320**, 454-456.
- Guili, G., Roechel, N., Scholl, U., Mattei, M.G. and Guellaen, G. (1993) Colocalization of the genes coding for the  $\alpha_3$  and  $\beta_3$  subunits of the soluble guanylyl cyclase to human chromosome 4 at q31.3-q33. *Hum.Genet.*, **91**, 257-260.

- Gupta, G., Azam, M., Yang, L. and Dazinger, R. (1997) The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide: potential relevance to regulation of blood pressure. *J.Clin.Invest.*, **100**, 1488-1492.
- Gupta, G., Kim, J., Yang, L., turley, S.L. and Danziger, R.S. (1997) Expression and purification of soluble, active heterodimeric guanylyl cyclase from baculovirus. *Protein.Expr.Purif.*, **10**, 325-330.
- Guthmann, F., Mayer, B., Koesling, D., Kukuvet, W.R. and Böhme, E. (1992) Characterization of soluble platelet guanylyl cyclase with peptide antibodies. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **346**, 537-541.
- Guyton, A.C. (1988) Tratado de fisiología médica. *Interamericana McGraw-Hill, Madrid.*
- Haddah, I.Y., Crow, J.P., Hu, P., Ye, Y., Beckman, J.S. and Matalon, S. (1994) Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am.J.Physiol.*, **11**, L242-L249
- Hamra, F.K., Forte, L.R., Eber, S.L., Pidhorodeckyj, N.V., Krause, W.J., Freeman, R.H., Chin, D.T., Tompkins, J.A., Fok, K.F., Smith, C.E., Duffin, K.L., Siegel, N.R. and Currie, M.G. (1993) Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **90**, 10464-10468.
- Hardman, J.G. and Sutherland, E.W. (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J.Biol.Chem.*, **244**, 6363-6370.
- Harper, J.F. and Brooker, G. (1975) Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'O-acetylation by acetic anhydride in aqueous solution. *J.Cyclic Nucleotide Res.*, **1**, 207-218.
- Harteneck, C., Koesling, D., Söling, A., Schultz, G. and Böme, E. (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.*, **272**, 221-223.
- Hasegawa, M., Hidaka, Y., Wada, A., Hirayama, T. and Shimonshi, Y. (1999) The relevance of N-linked glycosilation to the binding of a ligand to guanylate cyclase C. *Eur.J.Biochem.*, **263**, 338-346.
- Hasegawa, M., Kawano, Y., Matsumoto, Y., Hidaka, Y., Fujii, J., Taniguchi, N., Wada, A., Hirayama, T. and Shimonshi, Y. (1999) Expression and characterization of the extracellular domain of guanylate cyclase C from a baculovirus and Sf21 insect cells. *Protein.Expr.Purif.*, **15**, 271-281.

- Hassid, A., Yao, J. and Huang, S. (1999) NO alters cell shape and motility in aortic smooth muscle cells via protein tyrosine phosphatase 1B activation. *Am.J.Physiol.*, **277(Heart Circ. Physiol. 46)**, H1014-H1026
- Haycock, J.W. (1993) Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser<sup>19</sup>, Ser<sup>31</sup> and Ser<sup>40</sup>. *Neurochem.Res.*, **18**, 15-26.
- Herold, S. (1998) Kinetic and spectroscopic characterization of an intermediate peroxynitrite complex in the nitrogen monoxide induced oxidation of oxyhemoglobin. *FEBS.Lett.*, **439**, 85-88.
- Hess, D.T., Patterson, S.I., Smith, D.S. and Skene, J.H. (1993) Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature*, **366**, 562-565.
- Hevel, J.M., White, K.A. and Marlette, M.A. (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification of a flavoprotein. *J.Biol.Chem.*, **226**, 22789-22791.
- Hevel, J.M. and Marletta, M.A. (1994) Nitric-oxide synthase assays. *Methods.Enzymol.*, **233**, 250-258.
- Hillarp, N.A. and Hökfelt, B. (1955) Histochemical demonstration of noradrenaline and adrenaline in the adrenal medulla. *J.Histochem.Cytochem.*, **3**, 1-5.
- Hirata, M., Kohse, K.P., Chang, C.H., Ikebe, T. and Murad, F. (1990) Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.*, **265**, 1268-1273.
- Hobbs, A.J. (1997) Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *TiPS*, **18**, 484-491.
- Hofmann, F., Dostmann, W., Keilbach, A., Landgraf, W. and Ruth, P. (1992) Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim.Biophys.Acta Mol.Cell Res.*, **1135**, 51-60.
- Hogg, N., Singh, R.J. and Kalyanaraman, B. (1996) The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett.*, **382**, 223-228.
- Homer, K. and Wanstall, J. (1998) In vitro comparison of two NONOates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. *Eur.J.Pharmacol.*, **356**, 49-57.
- Hood, J. and Granger, H.J. (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.*, **273**, 23504-23508.
- Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. and Walter, U. (1994) Phosphorylation of local adhesion vasodilator-stimulated

- phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur.J.Biochem.*, **225**, 21-27.
- Huang, H., John, S.W. and Steinhilber, M.E. (1996) Organization of the mouse cardiac natriuretic peptide locus encoding BNP and ANP. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **28**, 1823-1828.
- Humbert, P., Niroomand, F., Ficher, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K., Gausepohl, H., Frank, R., Schulz, G. and Bohme, E. (1990) Purification of soluble guanylate cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur.J.Neurochem.*, **190**, 273-278.
- Hwang, T.L., Wu, C.C. and Teng, C.M. (1999) YC-1 potentiates nitric oxide-induced relaxation in guinea-pig trachea. *British Journal of Pharmacology*, **128**, 577-584.
- Ignarro, L.J. and Gruetter, C.A. (1981) Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. *Biochim.Biophys.Acta*, **631**, 221-231.
- Ignarro, L.J., Degnan, J.N., Baricos, W.H., Kadowitz, P.J. and Wolin, M.S. (1982) Activation of purified soluble guanylate cyclase by nitric oxide requires heme: comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim.Biophys.Acta*, **718**, 49-59.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **84**, 9265-9269.
- Iida, R., Yasuda, T., Aoyama, M., Tsubota, E., Matsuki, T. and Kishi, K. (2000) Age-related changes of gene expression in mouse kidney: fluorescence differential display-PCR analyses. *Mech.Ageing Dev.*, **113**, 135-144.
- Imaizumi, T., Watanabe, Y. and Yoshida, H. (1991) Phosphorylation of Gi protein by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits its dissociation into alpha-subunits and beta gamma-subunits by  $Mg^{2+}$  and GTP gamma. *Eur.J.Pharmacol.*, **207**, 189-194.
- Ingber, D.E. (1993) Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J.Cell.Sci.*, **104**, 613-627.
- Inoue, M. and Imanaga, I. (1995) Mechanism of activation of nonselective cation channels by putative M4 muscarinic receptor in guinea-pig chromaffin cells. *Br.J.Pharmacol.*, **114**, 419-427.
- Ioannidis, I., Bätz, M., Paul, T., Korth, H.-G., Sustmann, R. and DeGroot, H. (1996) Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-

- acetyl-D,L-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. *Biochem.J.*, **318**, 789-795.
- Ishikawa, E., Ishikawa, S., Davis, J.W. and Sutherland, E.W. (1969) Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J.Biol.Chem.*, **244**, 6371-6376.
- Itoh, H., Bird, I.M., Nakao, K. and Magness, R.R. (1998) Pregnancy increases soluble and particulate guanylate cyclases and decreases the clearance receptor of natriuretic peptides in ovine uterine, but not systemic, arteries. *Endocrinology*, **139**, 3329-3341.
- Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H. (1996) PIN :an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*, **274**, 774-777.
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. and Stamler, J.S. (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control [see comments]. *Nature*, **380**, 221-226.
- Jones, D.P. and Kennedy, F.G. (1983) Function of glutathione peroxidase in decomposition of hydrogen peroxide in isolated liver and heart cells. *Functions of glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and clinical aspects*. New York: Raven Press, 109-116.
- Jones, M.V. and Westbrook, G.L. (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.*, **19**, 96-101.
- Juifls, D.M., Soderling, S., Burns, F. and Beavo, J.A. (1999) Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, **135**, 67-104.
- Kamisaki, Y., Saheki, S., Nakane, M., Palmieri, J.A., Kuno, T., Chang, B.Y., Waldman, S.A. and Murad, F. (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J.Biol.Chem.*, **261**, 7236-7241.
- Kamisaki, Y., Waldman, S.A. and Murad, F. (1986) The involvement of catalytic site thiol groups in the activation of soluble guanylate cyclase by sodium nitroprusside. *Arch.Bioche.Biophys.*, **251**, 709-714.
- Kantor, D.B., Lanzrein, M., Sary, S.J., Sandoval, G.M., Smith, W.B., Sullivan, B.M., Davidson, N. and Schuman, E.M. (1996) A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. *Science*, **274**, 1744-1747.
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue

- preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J.Cyclic.Nucleotide.Res.*, **3**, 239-247.
- Katz, S.D., Biasucci, L., Sabba, C., Strom, J.A., Jondeau, G., Galvao, M., Solomon, S., Nikolic, S.D., Forman, R. and LeJemtel, T.H. (1992) Impaired endothelium-mediated vasodilation in the peripheral vasculature of patients with congestive heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.*, **19**, 918-925.
- Kaye, D.M., Wiviott, S.D., Kobzik, L., Kelly, R.A. and Smith, T.H. (1997) S-nitrosothiols inhibit neuronal norepinephrine transport. *Am.J.Physiol.*, **272**, H875-H883
- Keaney, J.F.Jr., Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O., Scharfstein, J., Vita, J.A. and Loscalzo, J. (1993) NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like proteins. *J.Clin.Invest.*, **91**, 1582-1589.
- Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M. and Wink, D.A. (1996) NONOates (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosages forms. *Methods in Enzymology*, **268**, 281-293.
- Keilbach, A., Ruth, P. and Hofmann, F. (1992) Detection of cGMP-dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur.J.Biochem.*, **208**, 467-473.
- Keith, R.F. and Elliot, F. (1979) The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Tech.Metabol.Res.*, **B204**, 1-20.
- Kelm, M., Feelisch, M., Spahr, R., Piper, H.M., Noack, E. and Schrader, J. (1988) Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **154**, 236-243.
- Kerr, J.F. (1972) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J.Phathol.*, **105**, 13-20.
- Kharitonov, V., Sunquist, A.R. and Sharma, V.S. (1994) Kinetics of nitric oxide autooxidation in aqueous solution. *J.Biol.Chem.*, **269**, 5881-5883.
- Kharitonov, V., Russwurm, M., Magde, D., Sharma, V.S. and Koesling, D. (1997) Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **239**, 284-286., **239**, 284-286.
- Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Magde, D. and Koesling, D. (1999) Kinetics and equilibria of soluble guanylate cyclase ligation by CO:: effect of YC-1. *Biochemistry*, **38**, 10699-10706.
- Kidokoro, Y. and Ritchie, A.K. (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from the rat adrenal medulla. *J.Physiol.*, **307**, 199-216.

- Kilpatrick, D.L., Ledbetter, F.H., Carson, K.A., Kirshner, A.G., Slepetis, R. and Kirshner, N. (1980) Stability of bovine adrenal medulla cells in culture. *J.Neurochem.*, **35**, 679-692.
- Kim, T.D. and Burstyn, J.N. (1994) Identification and partial purification of an endogenous inhibitor of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. *J.Biol.Chem.*, **269**, 15540-15545.
- Kim, Y.M., Bergonia, H. and Lancaster, J.R.J. (1995) Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, **374**, 228-232.
- Kim, Y.M., Talanian, R.V. and Billiar, T.R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J.Biol.Chem.*, **272**, 31138-31148.
- Kim, Y.M., Bombeck, C.A. and Billiar, T.R. (1999) Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ.Res.*, **84**, 253-256.
- Kimura, H. and Murad, F. (1974) Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J.Biol.Chem.*, **249**, 6910-6916.
- Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fässler, R. and Hofmann, F. (1999) Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking the cGMP-dependent protein kinase. *J.Neurosci.*, **19**, 48-55.
- Kloss, S., Bouloumie, A. and Mulsch, A. (2000) Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension*, **35**, 43-47.
- Klumpp, S., Cohen, P. and Schultz, J. (1990) Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 in paramecium, causes sustained  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent backward swimming in response to depolarizing stimuli. *EMBO J.*, **9**, 685-689.
- Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1990) Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem.J.*, **269**, 207-210.
- Ko, F.N., Wu, C.C., Kuo, S.C., Lee, F.Y. and Teng, C.M. (1994) YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*, **84**, 4226-4233.
- Kobayashi, S. and Coupland, R.E. (1993) Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. *J.Anat.*, **183**, 223-235.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S. and Stamler, J.S. (1994) Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, **372**, 546-548.
- Koesling, D., Herz, J., Mülsch, A., Niroomand, F., Hinsch, K.D., Böhme, E., Schultz, G. and Frank, R. (1988) The primary structure of the 70 kDa subunit of soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.*, **239**, 29-34.

- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G. and Böhme, E. (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylate cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett.*, **266**, 128-132.
- Koesling, D., Bohme, E. and Schulz, G. (1991) Guanylyl cyclases, a growing family of signal-transducing enzymes. *FASEB J.*, **5**, 2785-2791.
- Koesling, D., Schultz, G. and Bohme, E. (1991) Sequence homologies between guanylyl cyclases and structural analogies to other signal-transducing proteins. *FEBS*, **280**, 310-316.
- Koesling, D. and Friebe, A. (1999) Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.*, **135**, 41-65.
- Koller, K.J., Lowe, D.G., Bennett, G.L., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H. and Goeddel, D.V. (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*, **252**, 120-123.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.*, **5**, 834-842.
- Kowaluk, E.A., Seth, J. and Fung, H.L. (1992) Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **262**, 916-922.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H.A., Tang, W.J., Feinstein, P.G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R.R. and Gilman, A.G. (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*, **244**, 1558-1568.
- Kubo, S., Rector, T., Bank, A., Williams, R. and Heifetz, S. (1991) Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation*, **84**, 1589-1596.
- Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H. and Flavell, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, **384**, 368-372.
- Kwon, N.S., Stuehr, D.J. and Nathan, C.F. (1991) Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J.Exp.Med.*, **174**, 761-767.
- Kyprianou, N., English, H.F. and Isaacs, J.T. (1988) Activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate*, **13**, 103-107.



- Labarca, C. and Paigen, K. (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal.Biochem.*, **102**, 344-352.
- Landgraf, W., Roger, H., Göbel, C. and Hofmann, F. (1986) Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur.J.Biochem.*, **154**, 113-117.
- Lawson, D.M., Stevenson, C.E.M., Andrew, C.R. and Eady, R.R. (2000) Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase. *EMBO J.*, **19**, 5661-5671.
- Läfers, G. and Gyllenhammar, K. (1995) Measurement of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. A real-time, continuous assay of nitric oxide release by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.Methods*, **184**, 53-62.
- LeDonne, N.C. and Coffee, C.J. (1980) Evidence for calmodulin sensitive adenylate cyclase in bovine adrenal medulla. *Ann.N.Y.Acad.Sci.USA.*, **27**, 402-403.
- Lee, J., Kim, S.W., Kook, H., Kang, D.G., Kim, N.H. and Choi, K.C. (2000) Effects of L-arginine on cyclosporin-induced alterations of vascular NO/cGMP generation. *Nephrol.Dial.Transplant.*, **14**, 2634-2638.
- Lee, R.M., Li, L. and Kitazawa, T. (1997) Cyclic GMP causes  $\text{Ca}^{2+}$  desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J.Biol.Chem.*, **272**, 5063-5068.
- Lehmann, J. (2000) Nitric oxide donors - current trends in therapeutic applications. *Exp Opin.Ther.Patents*, **10(5)**, 559-573.
- Lemaire, S., Dumont, M., Mercier, P., Lemaire, I. and Calver, R. (1983) Biochemical characterization of various populations of isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem.Int.*, **5**, 193-200.
- Lepetre, N., Mironneau, J. and Morel, J.L. (1994) Both alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors subtypes stimulate voltage-operated L-type calcium channels in rat portal vein myocytes. Evidence for two distinct transduction pathways. *J.Biol.Chem.*, **269**, 29546-29552.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L. and Fontecave, M. (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **179**, 442-448.
- Lewis, R.S. and Deen, W.M. (1994) Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solution. *Chem.Res.Toxicol.*, **7**, 568-574.

- Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V. and Kim, Y.M. (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **240**, 419-424.
- Li, J., Bombeck, C.A., Yang, S., Kim, Y.M. and Billiar, T.R. (1999) Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **274**, 17325-17333.
- Lincoln, T.M., Komalavilas, P., Mac Millan-Crow, L.A. and Cornwell, T.L. (1995) cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Adv.Pharmacol.*, **34**, 305-322.
- Lincoln, T.M. and Cornwell, T.D. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.*, **7**, 328-338.
- Linder, L., Kiowski, W., Buhler, F. and Luscher, T. (1990) Indirect evidence of the release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted response in essential hypertension. *Circulation*, **81**, 1762-1767.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. and Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, **364**, 626-632.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Sucher, N.J., Pan, Z.H. and Stamler, J.S. (1996) Redox state, NMDA receptors and NO-related species [comment]. *Trends in Pharmacol.Sci.*, **17**, 186-187.
- Liu, H., Force, Y. and Bloch, K. (1997) Nerve growth factor decreases soluble guanylyl cyclase in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J.Biol.Chem.*, **272**, 6038-6043.
- Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D. and Hurley, J.H. (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94**, 13414-13419.
- Livett, B. (1984) Adrenal Medullary Chromaffin Cells in Vitro. *Physiol.Rev.*, **64**, 1103-1161.
- Llansola, M., Minana, M.D., Montoliu, C., Saez, R., Corbalan, R. and Felipo, V. (1999) Prenatal exposure to aluminum reduces expression of neuronal nitric oxide synthase and of soluble guanylate cyclase and impairs glutamatergic neurotransmission in rat cerebellum. *J.Neurochem.*, **73**, 718
- Louis, J.C., Revel, M.O. and Zwiller, J. (1993) Activation of guanylate cyclase through phosphorylation by protein kinase C in intact PC12 cells. *Biochim.Biophys.Acta.*, **1177**, 299-306.

- Loweth, A.C., Morgan, N.G., Williams, G.T. and Scarpello, J.H. (1997) Evidence of the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic B-cell line, HIT-T15. *FEBS Lett.*, **400**, 285-288.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P. and Waldman, S.A. (2000) Guanylyl cyclase and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol.Rev.*, **52**, 375-413.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. and Biel, M. (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, **393**, 587-591.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. and Biel, M. (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO Journal*, **18**, 2323-2329.
- MacFarland, R.T., Zelus, B.D. and Beavo, J.A. (1991) High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J.Biol.Chem.*, **266**, 136-142.
- Mannick, J.B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D.T., Zeng, M., Miao, Q.X., Kane, L.S., Gow, A.J. and Stamler, J.S. (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, **284**, 651-654.
- Marczin, N., Papapetropoulos, A. and Catravas, J.D. (1993) Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin- and IL-1 beta-induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.*, **265**, H1014-H1018
- Margulis, A. and Sitaramayya, A. (2000) Rate of deactivation of nitric oxide-stimulated soluble guanylate cyclase: influence of nitric oxide scavengers and calcium. *Biochemistry*, **39**, 1034-1039.
- Market, T., Vaandrager, A.B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., Jonge, H.R., Jarchau, T. and Lohmann, S.M. (1995) Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J.Clin.Invest.*, **96**, 822-830.
- Marley, S. and Prout, G.I. (1965) Physiology and pharmacology of the splanchnic-adrenal medullary junction. *J.Physiol.*, **180**, 483-513.
- Marsh, N. and Marsh, A. (2000) A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin.Exp.Pharmacol.and Physiol.*, **27**, 313-319.
- Martins, L.M. and Earnshaw, W.C. (1997) Apoptosis: alive and kicking in. *Trends in Cell Biol.*, **7**, 111-114.

- Mateo, J., Castro, E., Zwiller, J., Aunis, D. and Miras-Portugal, M.T. (1995) 5'-(N-Ethylcarboxamido) adenosine inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  influx and activates a protein phosphatase in bovine adrenal chromaffin cells. *J.Neurochem.*, **64**, 77-84.
- Mathews, W.R. and Kerr, S.W. (1993) Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **267**, 1529-1537.
- Matthews, J.R., Botting, C.H., Panico, M., Morris, H.R. and Hay, T. (1996) Inhibition of NF- $\kappa$ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic.Acids.Res.*, **24**, 2236-2242.
- Mayer, B., Jhon, M. and Böhme, E. (1990) Purification of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. *FEBS Lett.*, **277**, 215-219.
- Mayer, B., Schrammel, A., Klatt, P., Koesling, D. and Schmidt, K. (1995) Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J.Biol.Chem.*, **270**, 17355-17360.
- Mayer, B., Pfeiffer, S., Schrammel, A., Koesling, D., Schmidt, K. and Brunner, F. (1998) A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J.Biol.Chem.*, **273**, 3264-3270.
- McAllister-Lucas, L.M., Sonnenburg, W.K., Kadlecsek, A., Seger, D., Trong, H.L., Colbran, J.L., Thomas, M.K., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1993) The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *J.Biol.Chem.*, **268**, 22863-22873.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Nicotera, P., Wyllie, A.H. and Orrenius, S. (1988) Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicol.Lett.*, **42**, 123-130.
- McCoy, D.E., Guggino, S.E. and Stanton, B.A. (1995) The renal cGMP-gated cation channel: its molecular structure and physiological role. *Kidney.Int.*, **48**, 1125-1133.
- McGuire, J.J., Anderson, D.J., McDonald, B.J., Narayanasami, R. and Bennett, B.M. (1998) Inhibition of NADH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate. *Biochem.Pharmacol.*, **56**, 881-893.
- Meffert, M.K., Haley, J.E., Schuman, E.M., Schulman, H. and Madison, D.V. (1994) Inhibition of hippocampal heme oxygenase, nitric oxide synthase, and long-term potentiation by metalloporphyrins. *Neuron*, **13**, 1225-1233.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu.Rev.Biochem.*, **52**, 711-760.

- Meriney, S.D., Gray, D.B. and Pilar, G.R. (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature*, **369**, 336-339.
- Meyer, M., Jensen, O.N., Barofsky, E., Barofsky, D.F. and Reed, D.J. (1994) Thioredoxin alkylation by a dihaloethane-glutathione conjugate. *Chem.Res.Toxicol.*, **7**, 659-665.
- Mikami, T., Kusakabe, T. and Suzuki, N. (1999) Tandem organization of medaka fish soluble guanylyl cyclase  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  subunit genes. *J.Biol.Chem.*, **274**, 18567-18573.
- Mikco, T.P., Schilling, R.J., Salvemini, D., Moore, W.M. and Currie, M.G. (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Analytical Biochemistry*, **214**, 11-16.
- Miles, A.M., Wink, D.A., Cook, J.C. and Grisham, M.B. (1996) Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology*, **268**, 105-120.
- Miles, A.M., Wink, D.A., Cook, J.C. and Grisham, M.B. (1998) A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J.Biol.Chem.*, **273**, 3264-3270.
- Miras-Portugal, M.T., Rotllán, P. and Aunis, D. (1985) Incorporation of adenosine into nucleotides of chromaffin cells maintained in primary cultures. *Neurochem.Int.*, **7**, 89-93.
- Miras-Portugal, M.T., Pintor, J., Castro, E., Rodríguez-Pascual, F. and Torres, M. (1994) Diadenosine polyphosphates from neurosecretory granules: the search for receptors, signals and function. *Cell Signal Transduction, (Municio A.M.y Miras-Portugal M.T.eds.) Plenum Press, New York*, 169-186.
- Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Gono, T., Arai, S. and Abe, K. (1997) Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J.Biol.Chem.*, **272**, 22623-22629.
- Moldovan, L., Moldovan, N.I., Shon, R.H., Parikh, S.A. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000) Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. *Circ.Res.*, **86**, 549-557.
- Moncada, S., Rees, D.D., Schulz, R. and Palmer, R.M.J. (1991) Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitric oxide donors after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **88**, 2166-2170.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol.Rev.*, **43**, 109-142.

- Morita, K., Dohi, T., Kitayama, S. and Tsujimoto, A. (1991) Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. I. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free  $\text{Na}^+$  concentration by cyclic AMP elevation. II. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by cyclic AMP. *Neurochem.Int.*, **19**, 71-85.
- Moriwaki, Y., Kamisaki, Y., Itoh, T., Nagata, M. and Tamai, A. (1998) Cyclic 3',5'-guanosine monophosphate synthesis induced by atrial natriuretic peptide, C-type natriuretic peptide, and nitric oxide in the rat retina. *Jpn.J.Ophthalmol.*, **42**, 269-274.
- Morley, D. and Keefer, L.K. (1993) Nitric oxide/nucleophile complexes: a unique class of nitric oxide-based vasodilators. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **92**, S3-S9
- Murad, F., Mittal, C., Arnold, W.P., Katsuki, S. and Kimura, H. (1978) Guanylate cyclase: activation by azide, nitrocompounds, nitric oxide and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv.Cyclic Nucleotide Res.*, **9**, 145-158.
- Murad, F. (1986) Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*, **78**, 1-5.
- Murphy, M.E. and Noack, E. (1994) Nitric oxide Assay using hemoglobin method. *Methods in Enzymology*, **233**, 240-249.
- Mülsch, A., Bauersachs, J., Schäfer, A., Stasch, J.P., Kast, R. and Busse, R. (1997) Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cycalse, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *Br.J.Pharmacol.*, **120**, 681-689.
- Münzel, T., Sayegh, H., Freeman, B.A., Tarpey, M.M. and Harrison, D.G. (1995) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. *J.Clin.Invest.*, **95**, 187-194.
- Münzel, T., Li, H., Mollnau, H., Hink, U., Matheis, E., Hartmann, M., Oelze, M., Warnholtz, A., Duncker, L., Meinertz, T. and Forstermann, U. (2000) Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ.Res.*, **86**, E7-E12
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.
- Nakaki, T., Sasakawa, N., Yamamoto, S. and Kato, R. (1988) Functional shift from muscarinic to nicotinic cholinergic receptors involved in inositol trisphosphate

- and cyclic GMP accumulation during the primary culture of adrenal chromaffin cells. *Biochem.J.*, **251**, 397-403.
- Nakane, M., Shaeki, S., Kuno, T., Ishii, K. and Murad, F. (1988) Molecular cloning of a cDNAs coding for 70 kilodalton subunit of soluble guanylate cyclase from rat lung. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **157**, 1139-1147.
- Nakane, M., Arai, K., Shaeki, S., Kuno, T., Buechler, W. and Murad, F. (1990) Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J.Biol.Chem.*, **265**, 16841-16845.
- Nathan, C.F. and Hibbs, J.B. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr.Opin.Immunol.*, **3**, 65-70.
- Newby, A.C. and Henderson, A.H. (1990) Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu.Rev.Physiol.*, **52**, 661-674.
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 3030-3034.
- Nicholls, D.G. (1994) Proteins, transmitters and synapses. *Blackwell Scientific publications*,
- Nighorn, A., Byrnes, K.A. and Morton, D.B. (1999) Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *J.Biol.Chem.*, **274**, 2525-2531.
- Niina, H., Kobayashi, H., Yamamoto, R., Yuhi, T., Yanagita, T. and Wada, A. (1996) Receptors for atrial natriuretic peptide in adrenal chromaffin cells. *Biochem.Pharmacol.*, **51**, 855-858.
- Nooney, J.M., Peters, J.A. and Lambert, J.J. (1992) A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J.Physiol.Lond.*, **455**, 503-527.
- Núñez, L., Fuente, M.T., García, A.G. and García-Sancho, J. (1995) Differential  $\text{Ca}^{2+}$  responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am.J.Physiol.*, **269**, C1540-C1546
- Ogiwara, T., Negishi, T., Chik, C.L. and Ho, A.K. (1998) Differential effects of two protein kinase C inhibitors, calphostin C and G6976, on pineal cyclic nucleotide accumulation. *J.Neurochem.*, **71**, 1405-1412.

- Ohara-Imaizumi, M. and Kumakura, K. (1991) Dynamics of the secretory response evoked by endothelin-1 in adrenal chromaffin cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **17**, S156-S158.
- Ohlstein, E.H., Wood, K.S. and Ignarro, L.J. (1982) Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch.Biochem.Biophys.*, **218**, 187-198.
- Okazaki, M., Yanagihara, N., Izumi, F., Nakashima, Y. and Kuroiwa, A. (1989) Carbachol-induced cosecretion of immunoreactive atrial natriuretic peptides with catecholamines from cultured bovine adrenal medullary cells. *J.Neurochem.*, **52**, 222-228.
- Okere, C.O., Kaba, H., Takahashi, S. and Higuchi, T. (1996) Intrabulbar infusions of (-+)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine and L-arginine induce functional plasticity in the accessory olfactory bulb of female mice. *Neuroscience Letters*, **217**, 197-199.
- Olbregts, J. (1985) Termolecular reactions of nitrogen monoxide and oxygen: A still unsolved problem. *INT.J.Chem.Kinet.*, **17**, 835-848.
- Olson, L.J., Knych, E.T.J., Herzig, T.C. and Drewett, J.G. (1997) Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. *Hypertension*, **29**, 254-261.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.*, **14**, 453-501.
- Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A. and James, S.L. (1994) NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp.Biochem.Physiol.Pharmacol.Toxicol.Endocrinol.*, **108**, 11-18.
- Ou, J., Carlos, T.M., Watkins, S.C., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Kim, Y.M., Harbrecht, B.G. and Billiar, T.R. (1997) Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric oxide*, **1**, 404-416.
- Palacios, M., Knowles, R.G., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1989) Nitric Oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **165**, 802-809.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.



- Panza, J.A., Casino, P.R., Kilcoyne, C.M. and Quyyami, A.A. (1993) Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, **87**, 1468-1474.
- Papapetropoulos, A., Marzin, N., Snead, M., Cheng, C., Milici, A. and Catravas, J.D. (1994) Smooth muscle cell responsiveness to nitrovasodilators in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension*, **23**, 476-484.
- Papapetropoulos, A., Marcin, N., Mora, G., Milici, A., Murad, F. and Catravas, J.D. (1995) Regulation of vascular smooth muscle soluble guanylate cyclase activity, mRNA, and protein levels by cAMP-elevating agents. *Hypertension*, **28**, 696-704.
- Papapetropoulos, A., Go, C.Y., Murad, F. and Catravas, J.D. (1996) Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.*, **117**, 147-155.
- Papapetropoulos, A., Abou-Mohammed, G., Marzin, N., Murad, F., Caldwell, R.W. and Catravas, J.D. (1996) Downregulation of nitrovasodilator-induced cyclic GMP accumulation in cells exposed to endotoxin or interleukin-1 $\alpha$ . *Br.J.Pharmacol.*, **118**, 1359-1366.
- Papapetropoulos, A., Marcin, N. and Catravas, J.D. (1998) Cross-tolerance between endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide donors. *Eur.J.Pharmacol.*, **344**, 313-321.
- Parker, J.O. (1987) Nitrate therapy in stable angina. *N.Engl.J.Med.*, **316**, 1635-1642.
- Parkinson, S.J., Jovanovic, A., Jovanovic, S., Wagner, F., Terzic, A. and Waldman, S.A. (1999) Regulation of nitric oxide-responsive recombinant soluble guanylyl cyclase by calcium. *Biochemistry*, **38**, 6441-6448.
- Patrizio, M., Slepko, N. and Levi, G. (1997) Opposite regulation of adenylyl cyclase by protein kinase C in astrocyte and microglia cultures. *J.Neurochem.*, **69**, 1267-1277.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. and Tschopp, J. (1993) Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO Journal*, **12**, 371-377.
- Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneib, C., Wang, G.X., Korth, M., Aszódi, A., Andersson, K.E., Krombach, F., Ruth, P., Fässler, R. and Hofmann, F. (1998) Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J.*, **17**, 3045-3051.

- Pfeiffer, S., Schmidt, K. and Mayer, B. (2000) Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo. *J.Biol.Chem.*, **275**, 6346-6352.
- Phillips, J.H. (1982) Dynamics aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience*, **7**, 1595-1609.
- Pineda, J., Kogan, J.H. and Aghajanian, G.K. (1996) Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J.Neurosci.*, **16**, 1389-1399.
- Pollock, J.S., Förstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M. and Murad, F. (1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 10480-10484.
- Potter, L.R. and Garbers, D.L. (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **269**, 14636-14642.
- Potter, L.R. (1998) Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. *Biochemistry*, **37**, 2422-2429.
- Privat, C., Lantoine, F., Millanvoeye van Brussel, E., Devynck, J. and Devynck, M.-A. (1997) Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of the three methods of quantification. *Life Sciences*, **61**, 1193-1202.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J.Biol.Chem.*, **266**, 4244-4250.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **148**, 1482-1489.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. (1987) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, **92**, 639-646.
- Rai, R.M., Lee, F.Y., Rosen, A., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Koteish, A., Liew, F.Y., Zaragoza, C., Lowenstein, C. and Diehl, A.M. (1998) Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **95**, 13829-13834.

- Ramamurthi, A. and Lewis, R.S. (1997) Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chem.Res.Toxicol.*, **10**, 408-413.
- Rao, D.N.R., Elguindi, S. and O'Brien, P.J. (1991) Reductive metabolism of nitroprusside in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Arch.Biochem.Biophys.*, **286**, 30-37.
- Rapoport, R.M. (1986) Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ.Res.*, **58**, 407-410.
- Rengasamy, A. and Johns, R.A. (1993) Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Molecular Pharmacology*, **44**, 124-128.
- Reynolds, M.F., Parks, R.B., Burstyn, J.N., Shelver, D., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Roberts, G.P., Vogel, K.M. and Spiro, T.G. (2000) Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CoxA, a CO-sensing transcription activator from *R. rubrum*, reveals a five-coordinate NO-heme. *Biochemistry*, **39**, 388-396.
- Ritter, D., Taylor, J., Hoffmann, J., Carnaghi, L., Giddings, S., Zakeri, H. and Kwok, P.Y. (2000) Alternative splicing for the  $\alpha_1$  subunit of guanylate cyclase. *Biochem.J.*, **346**, 811-816.
- Rodriguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T. and Torres, M. (1995) Activation of NO:cGMP pathway by acetylcholine in bovine chromaffin cells. Possible role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the down-regulation of cGMP signalling. *Biochem.Pharmacol.*, **50**, 763-769.
- Rodriguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T. and Torres, M. (1996) Effect of cyclic GMP-increasing agents nitric oxide and C-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: Inhibitory role mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Neuropharmacology*, **49**, 1058-1070.
- Rodríguez-Pascual, F., Miras-Portugal, M.T. and Torres, M. (1995) Cyclic GMP-dependent protein kinase activation mediates inhibition of catecholamines secretion and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **67**, 149-157.
- Role, L.W. and Perlman, R.L. (1980) Purification of adrenal medullary chromaffin cells by density gradient centrifugation. *J.Neurosci.Methods*, **2**, 253-265.
- Rosenblum, W.I. (1992) Endothelium-derived relaxing factor in brain blood vessels is not nitric oxide. *Stroke*, **23**, 1527-1532.
- Roskams, A.J., Bredt, D.S., Dawson, T.M. and Ronnett, G.V. (1994) Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron*, **13**, 289-299.

- Rossig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Mulsch, A. and Dimmeler, S. (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J.Biol.Chem.*, **274**, 6823-6826.
- Rothmund, L., Friebe, A., Paul, M., Koesling, D. and Kreutz, R. (2000) Acute blood pressure effects of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase in normotensive and hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, **130**, 205-208.
- Ruetten, H., Mülsch, A., Schoenafinger, K., and Martorana, P. A. The NO-independent activator of the soluble guanylyl cyclase YC-1: pharmacological profile and tolerance studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 358, P18-57. 1998. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Ruetten, H., Zabel, U., Linz, W. and Schmidt, H. (1999) Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ.Res.*, **85**, 534-541.
- Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C. and Koesling, D. (1998) Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem.J.*, **335**, 125-130.
- Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. and Hofmann, F. (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase supresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-triphosphate production. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **90**, 2623-2627.
- Saavedra, J.E., Billiar, T.R., Williams, D.L., Kim, Y.M., Watkins, S.C. and Keefer, L.K. (1997) Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *J.Med.Chem.*, **40**, 1947-1954.
- Sanchez-Margalet, V., Lucas, M. and Goberna, R. (1994) Pancreastatin activates protein kinase C by stimulating the formation of 1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. *Biochem.J.*, **303**, 51-54.
- Sanchez-Margalet, V., Lucas, M. and Goberna, R. (1996) Pancreastatin action in the liver: Dual coupling to different G proteins. *Cell Signal*, **8**, 9-12.
- Sarkar, R., Meinberg, E.G., Stanley, J.C., Gordon, D. and Webb, R.C. (1996) Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.*, **78**, 225-230.
- Sastry, P.S. and Rao, K.S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J.Neurochem.*, **74**, 1-20.

- Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Nakane, M., Gorsky, L.D., Forstermann, U. and Murad, F. (1991) Purification of a soluble isoform of guanylate cyclase-activating-factor synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 365-369.
- Schmidt, H.H.W., Lohmann, S.M. and Walter, U. (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Bioch.et Bioph.Acta*, **1178**, 153-175.
- Schmidt, K., Desch, W., Klatt, P., Kukovetz, W.R. and Mayer, B. (1997) Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentrations in aerobic solutions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **355**, 457-462.
- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D. and Mayer, B. (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol.Pharmacol.*, **50**, 1-5.
- Schrammel, A., Koesling, D., Schmidt, K. and Mayer, B. (2000) Inhibition of purified soluble guanylyl cyclase by L-ascorbic acid. *Cardiovasc.Res.*, **47**, 602-608.
- Schulz, S., Yuen, P.S. and Garbers, D.L. (1991) The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends in Pharmacol.Sci.*, **12**, 116-120.
- Schulz, S., Wedel, B.J., Matthews, A. and Garbers, D.L. (1998) The cloning and expression of a new ganylyl cyclase orphan receptor. *J.Biol.Chem.*, **273**, 1032-1037.
- Schwartz, D., Mendoca, M., Schwartz, I., Xia, Y., Satriano, J., Wilson, C.B. and Blantz, R. (1997) Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolosaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 439-448.
- Schwarz, P.M., Rodriguez-Pascual, F., Koesling, D., Torres, M. and Förstermann, U. (1998) Functional coupling of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in controlling catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, **82**, 255-265.
- Sexton, D.J., Muruganandam, A., McKenney, D.J. and Mutus, B. (1994) Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: potential photochemotherapeutic applications. *Photochem.Photobiol.*, **59**, 463-467.
- Shabb, J.B. and Corbin, J.D. (1992) Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J.Biol.Chem.*, **267**, 5723-5726.
- Sharma, V. S., Magde, D., Kharitonov, V. G., and Koesling, D. Soluble guanylate cyclase: effect of YC-1 on ligation kinetics with carbon monoxide.

- Biochem.Biophys.Res.Comm. 254, 188-191. 1999. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Shimojo, T., Hiroe, M., Ishiyama, S., Ito, H., Nishikawa, T. and Marumo, F. (1999) Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cycli-GMP-dependent pathway. *Exp.Cell Res.*, **247**, 38-47.
- Shimouchi, A., Janssens, S.P., Bloch, D.B., Zapol, W.M. and Bloch, K.D. (1993) cAMP regulates soluble guanylate cyclase beta 1-subunit gene expression in RFL-6 rat fetal lung fibroblasts. *Am.J.Physiol.*, **265**, L456-L461
- Simmons, M.L. and Murphy, S. (1992) Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J.Neurochem.*, **59**, 897-905.
- Simon, W.C., Anderson, D.J. and Bennett, B.M. (1996) Inhibition of the pharmacological actions of glyceryl trinitrate after the electrophoretic delivery of a glutathione S-transferase inhibitor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **279**, 1535-1540.
- Simpson, P.J., Nighorn, A. and Morton, D.B. (1999) Identification of a novel guanylyl cyclase that is related to receptor guanylyl cyclases, but lacks extracellular and transmembrane domains. *J.Biol.Chem.*, **274**, 4440-4446.
- Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J.Biol.Chem.*, **271**, 18596-18603.
- Smith, R.P. and Krucyna, H. (1974) Nitroprusside produces cyanide poisoning via a reaction with hemoglobine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **191**, 557-563.
- Snyder, G.L., Fisone, G. and Greengard, P. (1994) Phosphorylation of DARPP-32 is regulated by GABA in rat striatum and substantia nigra. *J.Neurochem.*, **63**, 1766-1771.
- Soff, G.A., Cornwell, T.L., Cundiff, D.L., Gately, S. and Lincoln, T.M. (1997) Smooth muscle cell expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed by continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP, and cyclic AMP. *J.Clin.Invest.*, **100**, 2580-2587.
- Sontag, J.M., Thierse, D., Rouot, B., Aunis, D. and Bader, M.F. (1991) A pertussis - toxin-sensitive protein controls exocytosis in chromaffin cells at a step distal to the generation of second messengers. *Biochem.J.*, **274**, 339-347.
- Southam, E. and Garthwaite, J. (1991) Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neuroscience Lett.*, **130**, 107-111.
- Spedding, M. and Paoletti, R. (1992) Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharm.Rev.*, **44**, 363-376.

- Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C.R. and Loscalzo, J. (1992) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **89**, 7674-7677.
- Stamler, J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **78**, 931-936.
- Stone, J.R. and Marletta, M.A. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **33**, 5636-5640.
- Stone, J.R. and Marletta, M.A. (1996) Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochemistry*, **35**, 1093-1099.
- Stone, J.R. and Marletta, M.A. (1998) Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem.Biol.*, **5**, 255-261.
- Stryer, L. and Bourne, H.R. (1986) G proteins: a family of signal transducers. *Annu.Rev.Cell.Biol.*, **2**, 391-419.
- Stuart, A.E., Hudspeth, A.J. and Hall, Z.W. (1974) Staining of specific monoamine containing cells in the leech nervous system. *Cell.Tissue Res.*, **153**, 55-61.
- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weisw, M.F. and Nathan, C.F. (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **88**, 7773-7777.
- Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **168**, 863-870.
- Suenobu, N., Shichiri, M., Iwashina, M., Marumo, F. and Hirata, Y. (1999) Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **19**, 140-146.
- Sunahara, R., Beuve, A., Tesmer, J., Sprang, S., Garbers, D. and Gilman, A. (1998) Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J.Biol.Chem.*, **273**, 16332-16338.
- Suscheck, C.V., Krischel, V., Bruch-Gerharz, D., Berendji, D., Krutmann, J., Kroncke, K.D. and Kolb-Bachofen, V. (1999) Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J.Biol.Chem.*, **274**, 6130-6137.

- Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H. and Isaka, S. (1981) Purification and the primary structure of sperm-activity peptides from the jelly coat of sea urchin eggs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **99**, 1238-1244.
- Taimor, G., Hofataetter, B. and Piper, H.M. (2000) Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after stimulated ischemia. *Cardiovasc.Res.*, **45**, 588-594.
- Tamura, N., Ogawa, Y., Yasoda, A., Itoh, H., Saito, Y. and Nakao, K. (1996) Two cardiac natriuretic peptide genes (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) are organized in tandem in the mouse and human genomes. *J.Mol.Cell Cardiol.*, **28**, 1811-1815.
- Tao, J., Mallat, A., Gallois, C., Belmadani, S., Mery, P.F., Nhieu, J.T., Pavoine, C. and Lotersztajn, S. (1999) Biological effects of C-type natriuretic peptide in human myofibroblastic hepatic stellate cells. *J.Biol.Chem.*, **274**, 23761-23769.
- Tertyshnikova, S. and Fein, A. (1998) Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **95**, 1613-1617.
- Thiels, E., Kanterewicz, B.I., Knapp, L.T., Barrionuevo, G. and Klann, E. (2000) Protein phosphatase-mediated regulation of protein kinase C during long-term depression in the adult hippocampus in vivo. *J.Neurosci.*, **20**, 7199-7207
- Thomas, M.K., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1990) Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP. *J.Biol.Chem.*, **265**, 14971-14978.
- Thomas, M.K., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1990) Characterization of a purified bovine lung cGMP-binding cGMP phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.*, **265**, 14964-14970.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Thorpe, D.S. and Garbers, D.L. (1989) The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J.Biol.Chem.*, **264**, 6545-6549.
- Tischler, A.S., Riseberg, J.C., Hardenbrook, M.A. and Cherington, V. (1993) Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells *in vitro*. *J.Neurosci.*, **13**, 1533-1542.
- Tomita, T., Tsuyama, S., Imai, Y. and Kitagawa, T. (1997) Purification of bovine soluble guanylate cyclase and ADP-ribosylation on its small subunit by bacterial toxins. *J.Biochem.*, **122**, 531-536.



- Tomlinson, A. and Coupland, R.E. (1990) The innervation of the adrenal gland. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J.Anat.*, **169**, 209-236.
- Torphy, T.J., Freese, W.B., Rinard, G.A., Brunton, L.L. and Mayer, S.E. (1982) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases in airway smooth muscle. *J.Biol.Chem.*, **257**, 11609-11616.
- Torres, M., Ceballos, G. and Rubio, R. (1994) Possible role of nitric oxide in catecholamine secretion by chromaffin cells in the presence and absence of cultured endothelial cells. *J.Neurochem.*, **63**, 988-996.
- Tsou, K., Snyder, G.L. and Greengard, P. (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **90**, 3462-3465.
- Tsuchida, S., Hiraoka, M. and Muramatsu, I. (1995) Hyporesponsiveness to nitrovasodilators in rat aorta incubated with endotoxin and L-arginine. *Eur.J.Pharmacol.*, **281**, 251-254.
- Turko, I.V., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1999) Studies of the molecular mechanism of discrimination between cGMP and cAMP in the allosteric sites of the cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *J.Biol.Chem.*, **274**, 29038-29041.
- Ujiie, K., Hogart, L., Dazinger, R., Drewett, J.G., Yuen, P., Pang, I.H. and Star, R. (1994) Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **270**, 761-767.
- Unsicker, K., Griesser, G.H., Lindmar, R., Löffelholz, K. and Wolf, U. (1980) Establishment, characterization and fibre outgrowth of isolated bovine adrenal medullary cells in long-term cultures. *Neuroscience*, **5**, 1445-1460.
- Unsicker, K. and Müller, T.H. (1981) Purification of bovine adrenal chromaffin cells by differential plating. *J.Neurosci.Methods*, **4**, 227-241.
- Unsicker, K. (1993) The chromaffin cell: paradigm in cell, developmental and growth factor biology. *J.Anat.*, **183**, 207-221.
- van der Vliet, A., Eiserich, J.P., O'Neill, C.A., Halliwell, B. and Cross, C.E. (1995) Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch.Biochem.Biohys.*, **319**, 341-349.

- Vickroy, T.W. and Malphurs, W.L. (1995) Inhibition of nitric oxide synthase activity in cerebral cortical synaptosomes by nitric oxide donors: evidence for feedback autoregulation. *Neurochemical Research*, **20**, 299-304.
- Vinson, G.P., Pudney, J.A. and Whitehouse, B.J. (1985) The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal flow and steroidogenesis. *J.Endocr.*, **105**, 285-294.
- Vollmer, R.R. (1996) Selective neural regulation of epinephrine and norepinephrine cells in the adrenal medulla. Cardiovascular implications. *Clin.Exp.Hypertens.*, **18**, 731-751.
- Waalas, S.I. and Greengard, P. (1984) DARPP-32, a dopamine and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *Neuroscience*, **4**, 84-98.
- Waldman, S.A. and Murad, F. (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol.Rev.*, **39**, 163-196.
- Wallach, D. (1997) Placing death under control. *Nature*, **388**, 123-126.
- Wang, G.R., Zhu, Y., Halushka, P.V., Lincoln, T.M. and Mendelson, M.E. (1998) Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide : in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **95**, 4888-4893.
- Wang, X. and Robinson, P.J. (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J.Neurochem.*, **68**, 443-455.
- Wedel, B., Humert, P., Harteneck, C., Foerster, J., Malkewitz, J., Bohme, E. and Schultz, G. (1994) Mutation of His105 in the  $\alpha$ 1 subunit yields a nitric oxide insensitive form of soluble guanylate cyclase. *PNAS*, **91**, 2592-2596.
- Wegener, J.W., Gath, I., Förstermann, U. and Nawrath, H. (1997) Activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 in aortic smooth muscle but not in ventricular myocardium from rat. *Br.J.Pharmacol.*, **122**, 1523-1529.
- Wegener, J.W., Closs, E.I., Förstermann, U. and Nawrath, H. (1999) Failure of 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one (ODQ) to inhibit soluble guanylyl cyclase in rat ventricular cardiomyocytes. *Br.J.Pharmacol.*, **127**, 693-700.
- Wei, C.H., Beeson, C., Masucci, M.G. and Levitsky, V. (1998) A partially agonistic peptide acts as a selective inducer of apoptosis in CD8<sup>+</sup> CTLs. *J.Immunology*, **163**, 2601-2609.

- Weintraub, W.H., Negulescu, P.A. and Machen, T.E. (1992) Calcium signaling in endothelia: cellular heterogeneity and receptor internalization. *Am.J.Physiol.*, **263**, C1029-C1039
- Weitmann, S., Wursig, N., Navarro, M. and Kleuss, C. (1999) A functional chimera of mammalian guanylyl and adenylyl cyclases. *Biochemistry*, **38**, 3409-3413.
- Welsh, N., Eizirik, D.L., Bendtzen, K. and Sandler, S. (1991) Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology*, **129**, 3167-3173.
- Whalin, M.E., Scammell, J.G., Strada, S.J. and Thompson, W.J. (1991) Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol.Pharmacol.*, **39**, 711-777.
- White, A.A. and Aurbach, G.D. (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim.Biophys.Acta.*, **191**, 686-697.
- White, R.E., Lee, A.B., Shcherbatko, A.D., Lincoln, T.M., Schonbrunn, A. and Armstrong, D.L. (1993) Potassium channel stimulation by natriuretic peptides through cGMP-dependent dephosphorylation. *Nature*, **361**, 263-266.
- Williams, D.L.H. (1996) S-Nitrosotriols and role of metal ions in decomposition to nitric oxide. *Methods in Enzymology*, **268**, 299-308.
- Wilson, S.P. (1986) Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J.Neurosci.Methods*, **19**, 163-171.
- Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Allen, J.S. and et al. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, **254**, 1001-1003.
- Winkler, H. (1976) The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience*, **1**, 65-80.
- Wohlfart, P., Malinski, T., Ruetten, H., Schindler, U., Linz, W., Schoenafinger, K., Strobel, H., and Wiemer, G. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. *British Journal of Pharmacology* **128**, 1316-1322. 1999. (GENERIC)  
Ref Type: Journal (Full)
- Wolin, M.S., Wood, K.S. and Ignarro, L.J. (1982) Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme and nitrosylheme. *J.Biol.Chem.*, **257**, 13312-13320.

- Wu, C.C., Ko, F.N., Kuo, S.C., Lee, F.Y. and Teng, C.M. (1995) YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *British Journal Pharmacology*, **116**, 1973-1978.
- Wu, X.B., Brune, B., von Appen, F. and Ullrich, V. (1992) Reversible activation of soluble guanylate cyclase by oxidizing agents. *Arch.Bioche.Biophys.*, **294**, 75-82.
- Wyatt, T.A., Naftilan, A.J., Francis, S.H. and Corbin, J.D. (1998) ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.*, **274**, H448-H455
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomoboe, Y., Kabayashi, M., Mitsui, Y., Goto, H. and Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415.
- Yang, R.B., Foster, D.C., Garbers, D.L. and Fülle, H.J. (1995) Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92**, 602-606.
- Yin, Z.L. and Dusting, G.J. (1997) A nitric oxide donor (spermine-NONOate) prevents formation of neointima in rabbit carotid artery. *Clin.Exp.Pharmacol.and Physiol.*, **24**, 436-438.
- Yokoyama, Y., Ozawa, S., Seyama, Y., Namiki, H., Hayashi, Y., Kaji, K., Shirama, K., Shioda, M. and Kano, K. (1997) Enhancement of apoptosis in developing chick neural retina cells by basic fibroblast growth factor. *J.Neurochem.*, **68**, 2212-2215.
- Yu, F., Warburton, D., Wellington, S. and Dazinger, R. (1996) Assignment of GUCIA2, the gene coding for the  $\alpha 2$  subunit of soluble guanylate cyclase, to position 11q21-q22 on human chromosome 11. *Genomics*, **33**, 334-336.
- Yu, M., Cheng, Z.J., Guh, J.H., Lee, F.Y. and Kuo, S.C. (1995) Mechanism of anti-proliferation caused by YC-1, and indazole derivative, in cultured rat A10 vascular smooth-muscle cells. *Biochem.J.*, **306**, 787-792.
- Yuan, J., Angelucci, E., Lucarelli, G., Aljurf, M., Snyder, L.M., Kiefer, C.R., Ma, L. and Schrier, S.L. (1993) Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood*, **82**, 374-377.
- Yuen, P., Doolittle, L. and Garbers, D. (1994) Dominant negative mutants of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *J.Biol.Chem.*, **269**, 791-793.
- Yuen, P.S., Potter, L.R. and Garbers, D.L. (1990) A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*, **29**, 10872-10878.

- Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K. and Kawai, C. (1991) Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J.Biol.Chem.*, **266**, 12544-12547.
- Zabel, U., Weeger, M., La, M. and Schmidt, H. (1998) Human soluble guanylyl cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. *Biochem.J.*, **335**, 51-57.
- Zabel, U., Hausler, C., Weeger, M. and Schmidt, H. (1999) Homodimerization of soluble guanylate cyclase subunits. *J.Biol.Chem.*, **274**, 18149-18152.
- Zhang, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, **263**, 687-689.
- Zhao, Y. and Marletta, M. (1997) Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, **36**, 15959-15964.
- Zhou, X.B., Schlossmann, J., Hofmann, F. and Korth, M. (1996) Protein phosphatase 2A is essential for the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.*, **271**, 19760-19767.
- Zhuo, M., Hu, Y., Schultz, C., Kandel, E.R. and Hawkins, R.D. (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, **368**, 635-639.
- Zhuo, X.B., Schlossmann, J., Hofmann, F., Ruth, P. and Korth, M. (1998) Regulation of stably expressed and native BK channels from human myometrium by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase. *Pflügers Arch.*, **436**, 725-734.
- Zwiller, J., Revel, M.O. and Basse, P. (1981) Evidence for phosphorylation of rat brain guanylate cyclase by cAMP-dependent protein kinase. *Biochim.Biophys.Res.Comm.*, **101**, 1381-1387.
- Zwiller, J., Revel, M.O. and Malviya, A.N. (1985) Protein kinase C catalyzes phosphorylation of guanylate cyclase in vitro. *J.Biol.Chem.*, **260**, 1350-1353.